

猪肠病毒 G (EV-G) 荧光定量 PCR 检测方法的建立与四川地区分子流行病学调查

肖黛^{#1}, 张路文^{#1}, 李施倩¹, 俞恩波¹, 曹三杰^{1,2}, 黄小波^{*1,2}

1 四川农业大学动物医学院猪病研究中心, 四川 成都 611130

2 农业农村部兽药与兽医诊断技术四川科学观测实验站, 四川 成都 611130

肖黛, 张路文, 李施倩, 俞恩波, 曹三杰, 黄小波. 猪肠病毒 G (EV-G) 荧光定量 PCR 检测方法的建立与四川地区分子流行病学调查[J]. 微生物学通报, 2022, 49(11): 4809-4820

Xiao Dai, Zhang Luwen, Li Shiqian, Yu Enbo, Cao Sanjie, Huang Xiaobo. Establishment of RT-qPCR detection method and molecular epidemiological investigation of Enterovirus G (EV-G) in Sichuan province[J]. Microbiology China, 2022, 49(11): 4809-4820

摘要: 【背景】猪肠病毒 G (Enterovirus G, EV-G) 在猪群中普遍存在, 可引起猪的皮肤损伤、肌肉麻痹、肺炎、发热、腹泻等, 也存在无症状感染。【目的】建立检测 EV-G 的荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR, RT-qPCR) 方法并开展四川地区分子流行病学调查。【方法】根据 EV-G 的 5'UTR 基因保守序列设计特异性引物, 建立可检测 EV-G 各基因型的 RT-qPCR, 并评估其灵敏性、特异性和重复性, 开展四川地区 EV-G 的流行调查。【结果】标准品在 1.89×10^2 – 1.89×10^8 copies/ μ L 浓度范围内线性关系良好; 在特异性试验中, 其他 9 种猪病毒(猪德尔塔冠状病毒、猪流行性腹泻病毒、传染性胃肠炎病毒、日本乙型脑炎病毒、猪萨佩罗病毒、猪细小病毒、猪圆环病毒、猪伪狂犬病病毒和猪繁殖与呼吸综合征病毒)检测均为阴性; 最低检测浓度为 1.89×10^1 copies/ μ L; 组内和组间变异系数分别小于 1% 和 2%。检测 2013–2021 年四川省 431 份猪腹泻样品, EV-G 总体阳性率为 31.1%, 表明该病毒在四川地区的感染较普遍。随机选取 9 份四川的 EV-G 阳性样品扩增 VP1 基因并测序分析, 发现四川 EV-G 流行的基因型包括 G1、G3、G4 和 G9, 但以 EV-G1 为优势基因型。【结论】本研究建立了一种检测 EV-G 各基因型的 RT-qPCR 方法, 并初步掌握了四川 EV-G 的流行现状, 为后续深入开展该病毒的研究奠定了基础。

关键词: 猪肠病毒 G; 荧光定量 PCR; 建立; 流行病学; 调查

基金项目: 四川省“十四五”川猪重大科技专项(2021ZDZX0010)

#对本文贡献相同

Supported by: Sichuan Science and Technology Program (2021ZDZX0010)

#These authors equally contributed to this work

*Corresponding author: E-mail: huangxiaobo@sicau.edu.cn

Received: 2022-04-08; Accepted: 2022-05-31; Published online: 2022-08-09

Establishment of RT-qPCR detection method and molecular epidemiological investigation of Enterovirus G (EV-G) in Sichuan province

XIAO Dai^{#1}, ZHANG Luwen^{#1}, LI Shiqian¹, YU Enbo¹, CAO Sanjie^{1,2}, HUANG Xiaobo^{*1,2}

1 Research Center for Swine Disease, College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, Sichuan, China

2 Sichuan Science-Observation Experimental Station of Veterinary Drugs and Veterinary Diagnostic Technology, Ministry of Agriculture, Chengdu 611130, Sichuan, China

Abstract: [Background] Enterovirus G (EV-G), commonly existing in pigs, can cause skin injury, muscle paralysis, pneumonia, fever, diarrhea and asymptomatic infection of pigs. [Objective] To establish a real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) for EV-G detection and carry out molecular epidemiological investigation in Sichuan province. [Methods] On the basis of primer design referring to the EV-G 5'UTR gene, SYBR Green I RT-qPCR (RT-qPCR for short) detecting all genotypes of EV-G was established and its sensitivity, specificity and repeatability were evaluated. Epidemic investigation of EV-G in Sichuan province was made with the established PCR method. [Results] The results showed that the C_t value of the RT-qPCR had a good linear relationship with the standard sample template in the concentration range of 1.89×10^2 – 1.89×10^8 copies/ μ L. In the specificity test, nine other swine viruses (PDCoV, PEDV, TGEV, JEV, PSV, PPV, PCV, PRV and PRRSV) could not be detected with the method. The minimum detection limitation was 1.89×10^1 copies/ μ L, and the intra-assay and inter-assay coefficients of variation were lower than 1% and 2%, respectively. A total of 431 samples with diarrhea in Sichuan province were detected by RT-qPCR, and the total positive rate of EV-G was 31.1%, indicating the virus was widespread in Sichuan province. Nine EV-G positive samples from Sichuan province were randomly selected to amplify *VPI* gene for sequencing analysis. It was found that the prevalent genotypes of EV-G in Sichuan province were G1, G3, G4, and G9, but EV-G1 was the dominant genotype. [Conclusion] In this study, a RT-qPCR method for detecting EV-G genotypes is established, and the epidemic status of EV-G in Sichuan province is preliminarily mastered, which lays a foundation for further research on the virus.

Keywords: Enterovirus G (EV-G); RT-qPCR; establishment; epidemiology; investigation

猪肠病毒 G (Enterovirus G, EV-G) 是一种常见的猪肠道病原体, 属于小 RNA 病毒科 (Picornaviridae) 肠道病毒属 (Enterovirus), 为无囊膜的单股正链 RNA 病毒, 依据基因型可分为 G1–G20。该病毒基因组长度约为 7.5 kb, 结构包括 5'UTR、结构蛋白 (VP4、VP2、VP3、VP1)、非结构蛋白 (2A、2B、2C、3A、3B、3C^{pro}、3D^{pol})

和 3'UTR, 其中 3'UTR 和 5'UTR 最保守^[1]。EV-G 可造成猪的皮肤损伤、脑脊髓灰质炎、肺炎、发热、母猪繁殖障碍等, 也存在无症状感染^[2-4]。近年报道的一些猪腹泻案例中, 检测出发生重组的 EV-G 毒株, 表明该病毒可能引起猪胃肠道疾病^[5-7]。1983 年, EV-G 在英国被首次分离^[8], 随后美国、越南、日本、韩国、中国、印度等

多个国家均有报道^[9-15]。EV-G 在各国检出率有较大差别,但阳性率普遍较高,报道显示泰国 73 个猪场的 EV-G 检出率为 71.2% (52/73)^[15];越南 102 个猪场中 EV-G 检出率高达 90% (92/102)^[2];西班牙 6 个农场猪群中 EV-G 的感染率在 2%–82% 之间^[16]。国内关于 EV-G 的研究报道较少, Yang 等^[13]对 2008–2009 年安徽和上海的 447 份健康猪群粪便样本进行了 EV-G 检测,发现阳性率为 8.3%;杨春杰等^[17]检测广西壮族自治区 2017–2018 年共 222 份临床腹泻样品,结果表明,总样本 EV-G 阳性率为 6.76%,猪场阳性率高达 16.98%;2020 年,李安琪^[18]检测江西 43 份仔猪粪便,结果 5 份样品为 EV-G 阳性,阳性率为 11.6%。

EV-G 现有的检测方法包括病毒分离鉴定、普通 PCR、荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR, RT-qPCR) 和宏基因组测序等^[19-22]。病毒分离操作烦琐周期长,不适用于临床检测;普通 PCR 灵敏性和特异性较差,而且不能对病毒进行定量检测;宏基因组测序对仪器设备要求高,价格昂贵;RT-qPCR 因其操作简单、快速和批量检测等优点,已广泛用于病毒检测^[17]。EV-G 5'UTR 在不同基因型中保守性高,是合适的荧光定量 PCR 引物设计靶点,但目前尚无关于该区域 RT-qPCR 检测方法的系统报道。因此,本研究基于 EV-G 的 5'UTR 基因序列,建立可同时检测 EV-G 多种基因型的 RT-qPCR 检测方法,并应用于检测 2013–2021 年四川地区猪场腹泻样品,以期初步掌握四川该病毒的分子流行病学情况。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 毒株与病料

EV-G、猪德尔塔冠状病毒 (porcine

deltacoronavirus, PDCoV)、猪流行性腹泻病毒 (porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)、传染性胃肠炎病毒 (transmissible gastroenteritis virus, TGEV)、日本乙型脑炎病毒 (Japanese encephalitis virus, JEV)、猪萨佩罗病毒 (porcine sapelovirus, PSV) 和猪细小病毒 (porcine parvovirus, PPV) 由四川农业大学猪病研究中心分离和保存;猪圆环病毒 (porcine circovirus, PCV)、猪伪狂犬病病毒 (pseudorabies virus, PRV)、猪繁殖与呼吸综合征病毒 (porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV) 的核酸由本实验室保存;临床样本收集自 2013–2021 年四川地区猪群的腹泻病料。

1.1.2 主要试剂、培养基和仪器

RNA 提取试剂盒, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 反转录试剂盒、pMD19-T 载体, 宝生物工程(大连)有限公司; Omega 质粒提取试剂盒, 广州飞扬生物工程有限公司; 2×Rapid Taq Master Mix 和 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix, 南京诺唯赞生物科技有限公司; 大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 北京博迈德基因技术有限公司。含氨苄抗性的 LB 固体培养基(g/L): 琼脂粉 15.0, 胰蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, 氯化钠 10.0。氨苄青霉素终浓度为 100 μ g/mL。荧光定量 PCR 仪, 罗氏诊断有限公司。

1.2 方法

1.2.1 引物的设计与合成

根据 GenBank 公布的 EV-G 5'UTR 基因序列(登录号为 MT274668、LC549657、HQ702854、JN807387 和 JQ818253), 用 MEGA X 软件的 Cluster W 进行多序列比对, 针对 EV-G 各基因型毒株均保守的区域设计特异性引物(EV-G-F: 5'-GCCATAGGACGCCATTTCA-3'; EV-G-R: 5'-AAGTAGTCGGTTCGCCACA-3'), 目的片段

长度为 161 bp,引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.2.2 阳性质粒标准品的制备

用 TRIzol 法提取 EV-G 的总 RNA 并反转录获得 cDNA 模板, PCR 扩增目的片段, PCR 反应体系(15 μ L): 2 \times Rapid Taq Master Mix 7.5 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 0.5 μ L, cDNA 模板 1 μ L, ddH₂O 5.5 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 3 min; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 58 $^{\circ}$ C 15 s, 72 $^{\circ}$ C 15 s, 共 40 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min; 4 $^{\circ}$ C 保存。经 2%琼脂糖凝胶电泳鉴定后,克隆到 pMD19-T 载体中构建重组质粒 pEV-G-5'UTR,再转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中,涂布含有 100 μ g/mL 氨苄抗性的 LB 固体培养基筛选,挑选阳性克隆菌落测序验证。提取构建成功的质粒,测定浓度作为阳性标准品。

1.2.3 RT-qPCR 反应条件的优化

以构建好的标准质粒为模板,反应体系设为 20 μ L,在反应体系中加入引物,使其终浓度分别为 0.1、0.2、0.3、0.4 和 0.5 μ mol/L;根据扩增曲线及熔解曲线进行引物浓度优化筛选。优化后的体系分别以 52、54、56、58 和 60 $^{\circ}$ C 不同退火温度进行反应,优化反应温度,最终确定最佳反应体系与条件。

1.2.4 标准曲线的建立

根据测定的标准质粒浓度计算可得拷贝数 1.89×10^{10} copies/ μ L,以标准质粒为模板,进行 10 倍比稀释,采用最佳反应体系和条件扩增,根据所得的标准质粒浓度和 C_t 值的对应关系绘制标准曲线。

1.2.5 灵敏性试验

将标准品质粒 10 倍比稀释后,按照已建立的 EV-G RT-qPCR 方法进行检测。同时用普通 PCR 检测,设置阴性对照,对比普通 PCR 和 RT-qPCR 可检测的最低浓度,比较两者灵敏性。

1.2.6 特异性试验

为验证建立的 RT-qPCR 的特异性,使用相同的反应体系和条件,同时检测 EV-G、PDCoV、PEDV、TGEV、JEV、PSV、PCV、PPV、PRV 和 PRRSV,设置阴性对照。

1.2.7 重复性试验

以拷贝数为 1.89×10^5 – 1.89×10^7 copies/ μ L 的标准质粒为模板,同时设置阴性对照,每个样品重复 3 次,计算 C_t 值的平均数、标准差和变异系数,建立组内重复试验;以拷贝数为 1.89×10^5 – 1.89×10^7 copies/ μ L 的标准质粒为模板,同时设置阴性对照,每个样品重复 3 次,在不同时间段分别进行 3 次重复试验,计算 C_t 值的平均数、标准差和变异系数,建立组间重复试验,验证该方法的重复性。

1.2.8 四川地区 EV-G 的流行病学调查及毒株 VP1 序列分析

收集四川部分地区 2013–2021 年腹泻猪群的临床样本 431 份,用建立的 RT-qPCR 方法进行检测,统计检测结果,掌握四川地区 EV-G 的感染情况。从 EV-G 阳性样本随机抽取 9 份,参照 Van Dung 等^[2]的方法通过巢式 RT-PCR 方法(引物序列见表 1)扩增 VP1 基因后连接 pMD19-T 载体测序,对 EV-G 进行验证并用 MEGA X 软件对 9 株 EV-G 的 VP1 基因进行系统发育分析,使用 EVOLVIEW 在线网站对系统发育树进行美化,判断四川地区 EV-G 的主要流行毒株。

表 1 EV-G 巢式 RT-PCR 引物序列信息^[2]

Table 1 EV-G nested RT-PCR primer sequence information^[2]

引物名称	序列
Primer name	Sequence (5'→3')
VP1 Outer-F	TCTTCCCAYTC DASRTTBTCCCA
VP1 Outer-R	GCTGGKTATRTKACYGGDTGGTWC
VP1 Inner-F	TGGCWGCACARCCNAAAYTTYTC
VP1 Inner-R	GGGTKGCAAGRKGCTRTTCA

2 结果与分析

2.1 阳性质粒标准品的制备结果

以 EV-G 的 cDNA 为模板, 扩增出 161 bp 的目的片段(图 1), 将目的片段克隆到 pMD19-T 载体中获得重组质粒 pEV-G-5'UTR。通过测序分析, 确定插入序列为 EV-G 5'UTR 片段, 表明重组质粒 pEV-G-5'UTR 构建成功, 可作为阳性质粒标准品。经紫外分光光度计测得 pEV-G-5'UTR 浓度为 59.12 ng/ μL , 拷贝数为 1.89×10^{10} copies/ μL 。

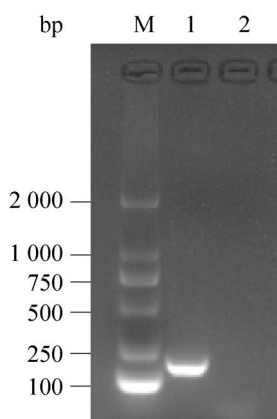


图1 EV-G 5'UTR 基因的PCR扩增 M: DL2000 DNA Marker; 1: 阳性样品; 2: 阴性对照
Figure 1 PCR amplification of EV-G 5'UTR gene. M: DL2000 DNA Marker; 1: EV-G positive sample; 2: Negative control.

2.2 RT-qPCR 反应条件优化结果

经优化可得最佳引物浓度为 0.5 $\mu\text{mol/L}$, 最佳退火温度为 58 $^{\circ}\text{C}$ 。扩增体系(20 μL): 2 \times Cham Q Universal SYBR qPCR Master Mix 10 μL , 上、下游引物各 0.5 μL , 标准质粒模板 1 μL , 灭菌水 8 μL ; 扩增条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 收集荧光, 共 40 个循环; 熔解曲线 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 65 $^{\circ}\text{C}$ 60 s, 97 $^{\circ}\text{C}$ 1 s。

2.3 标准曲线

将标准品质粒进行 10 倍倍比稀释, 选取拷贝数为 1.89×10^2 – 1.89×10^8 copies/ μL 的质粒为模板进行扩增(图 2), 绘制标准曲线。该标准曲线扩增效率 $E=1.96$, $R^2=0.996$, 斜率为 -3.428, 截距为 37.06, 得到的标准曲线方程为 $y=-3.428x+37.06$ (图 3)。熔解曲线峰图单一, 无二聚体, 阴性无扩增产物, 表明引物特异性良好(图 4)。

2.4 灵敏性试验结果

将标准品质粒 10 倍倍比稀释, 取拷贝数为 1.89×10^1 – 1.89×10^8 copies/ μL 的质粒为模板进行荧光定量扩增, 结果显示, 拷贝数为 1.89×10^1 copies/ μL 时, 该 RT-qPCR 方法仍能检测到荧光值(图 5)。然而普通 PCR 能检测到的最低限为 1.89×10^2 copies/ μL (图 6), 该荧光定量方法较普通 PCR 灵敏 10 倍。

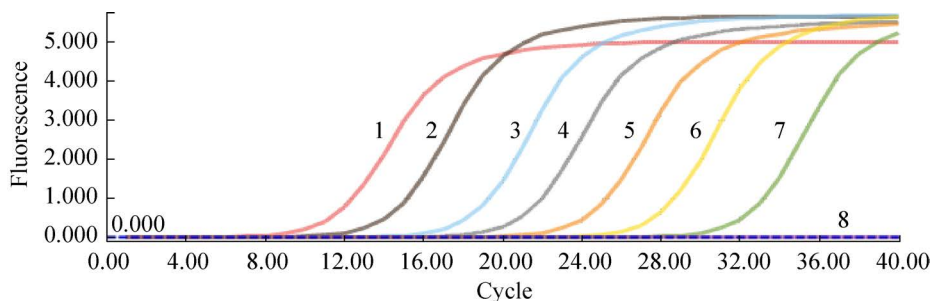


图2 EV-G RT-qPCR 扩增曲线 1–7: pEV-G-5'UTR 质粒浓度分别为 1.89×10^8 – 1.89×10^2 copies/ μL ; 8: 阴性对照

Figure 2 Amplification curve of EV-G RT-qPCR. 1–7: pEV-G-5'UTR plasmid concentrations were 1.89×10^8 – 1.89×10^2 copies/ μL ; 8: Negative control.

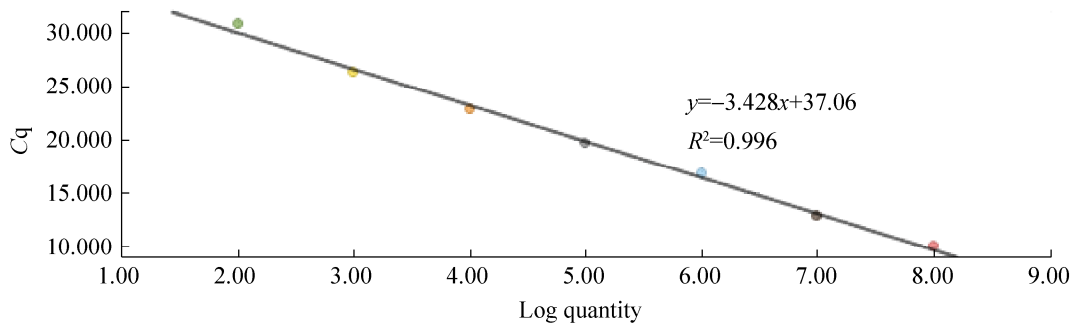


图3 EV-G RT-qPCR 标准曲线

Figure 3 Standard curve of EV-G RT-qPCR.

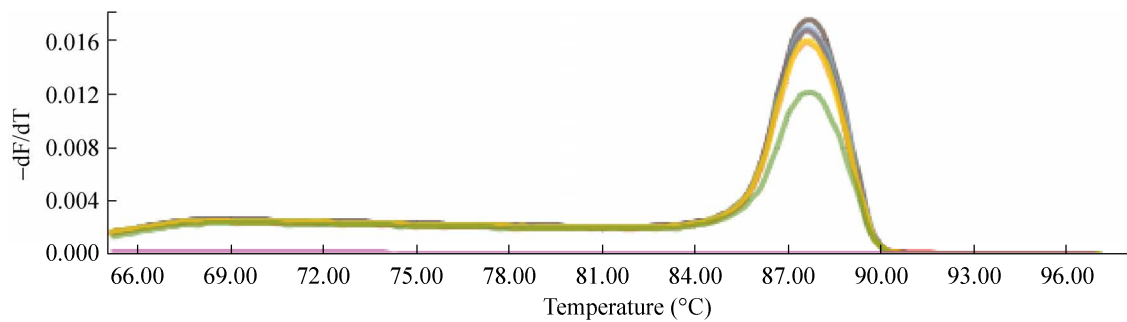


图4 EV-G RT-qPCR 溶解曲线

Figure 4 Melting curve of EV-G RT-qPCR.

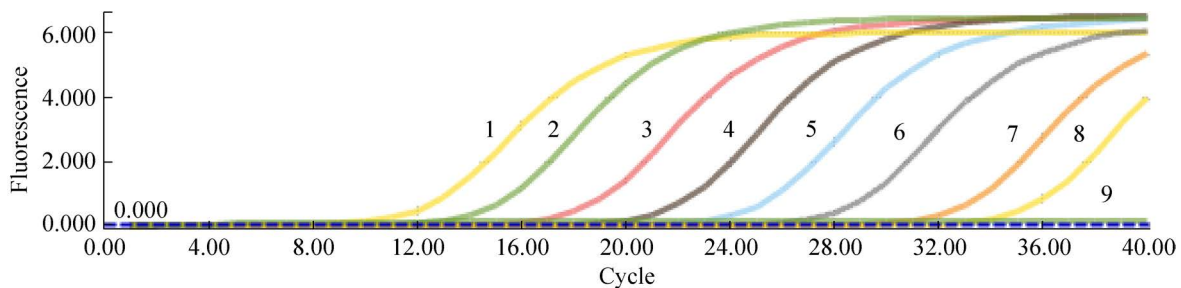


图5 EV-G RT-qPCR 灵敏性试验 1-8: pEV-G-5'UTR 质粒浓度分别为 1.89×10^8 – 1.89×10^1 copies/ μ L; 9: 阴性对照

Figure 5 Sensitivity test of EV-G RT-qPCR. 1-8: pEV-G-5'UTR plasmid concentrations were 1.89×10^8 – 1.89×10^1 copies/ μ L; 9: Negative control.

2.5 特异性试验结果

在本方法的特异性检测中, PDCoV、PEDV、TGEV、JEV、PSV、PCV、PPV、PRV 和 PRRSV 均未出现阳性扩增, 仅 EV-G 阳性质粒出现特异性扩增曲线(图 7), 证明该方法特异性良好。

2.6 重复性试验结果

选定拷贝数为 1.89×10^5 – 1.89×10^7 copies/ μ L 的标准质粒为模板分别进行 3 次重复实验, 根据 C_t 值计算标准差及变异系数, 结果显示, 组内重复试验变异系数在 0.06%–0.15% 之间(表 2), 组间重复试验变异系数在 0.30%–1.29%

之间(表 3), 表明该方法稳定性较高、重复性好。

2.7 四川地区 EV-G 的分子流行病学调查结果

2.7.1 四川地区猪群 EV-G 感染情况统计

用建立的 RT-qPCR 检测我国四川地区 2013–2021 年的 431 份腹泻猪群临床样品, 结果显示 134 份样品呈 EV-G 阳性, 阳性率为 31.1%。除遂宁市未检出 EV-G 外, 其余各市阳性检出率在 12.5%–75.0% 之间(表 4)。2013–2021 年 EV-G 检出率在 16.7%–42.9% 之间(图 8)。

2.7.2 四川地区 EV-G 毒株的 VPI 序列分析

挑选 9 份阳性样本, 扩增 VPI 基因后连接 pMD19-T 载体测序, 证实均为 EV-G。将 9 株 EV-G 的 VPI 序列(红色五星标注)与 GenBank 中其他不同基因型 EV-G 的 VPI 序列进行系统发育分析, 发现其中有 5 株与 EV-G1 聚类在同一分支, 2 株聚类于 EV-G4 分支, 其余 2 株分别属于 EV-G3 和 EV-G9 基因型(图 9)。

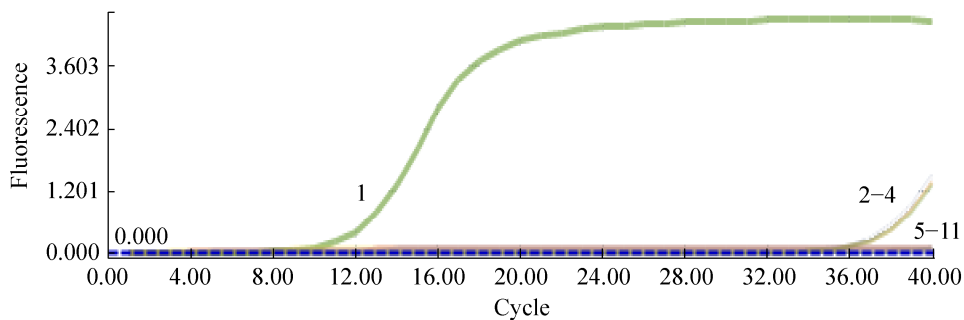


图 7 EV-G RT-qPCR 特异性试验 1: EV-G; 2–4: PRRSV、PEDV 和 PDCoV; 5–11: TGEV、JEV、PPV、PRV、PCV、PSV 和阴性对照

Figure 7 Specificity of EV-G RT-qPCR. 1: EV-G; 2–4: PRRSV, PEDV and PDCoV; 5–11: TGEV, JEV, PPV, PRV, PCV, PSV and negative control.

表 2 组内重复结果

Table 2 Intra-assay duplicate results

模板浓度 Concentration of template (copies/ μ L)	C_t 值 C_t value			标准差 Standard deviation	变异系数 Coefficient of variation (%)
	1	2	3		
1.89×10^5	20.81	20.80	20.78	0.01	0.06
1.89×10^6	17.38	17.37	17.43	0.03	0.15
1.89×10^7	13.55	13.58	13.57	0.01	0.09

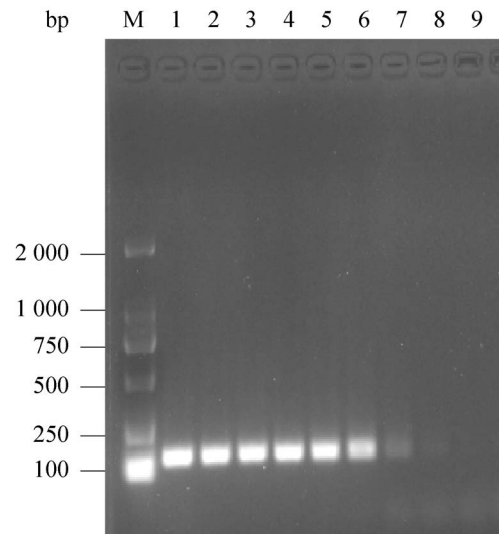


图 6 PCR 检测目标基因灵敏性试验 1–8: pEV-G-5'UTR 质粒浓度分别为 1.89×10^8 – 1.89×10^1 copies/ μ L; 9: 阴性对照

Figure 6 Electrophoresis analysis of sensitivity of PCR for detecting the target gene. 1–8: pEV-G-5'UTR plasmid concentrations were 1.89×10^8 – 1.89×10^1 copies/ μ L; 9: Negative control.

表3 组间重复结果

Table 3 Inter-assay duplicate results

标准品浓度 Concentration of template (copies/ μ L)	C _t 值 C _t value			标准差 Standard deviation	变异系数 Coefficient of variation (%)
	1	2	3		
	1.89×10^5	20.80	20.24		
1.89×10^6	17.39	17.26	17.65	0.03	0.93
1.89×10^7	13.57	13.53	13.63	0.01	0.30

表4 四川不同地区 EV-G 的感染统计表

Table 4 Statistical tables of EV-G infection in different areas of Sichuan province

地区 Area	样本数 Samples	阳性样本数 Positive samples	阳性率 Positive rate (%)
成都 Chengdu	136	28	20.6
绵阳 Mianyang	123	44	35.8
宜宾 Yibin	46	20	43.5
雅安 Ya'an	7	3	42.9
广元 Guangyuan	5	3	60.0
德阳 Deyang	32	4	12.5
巴中 Bazhong	12	4	33.3
达州 Dazhou	7	1	14.3
眉山 Meishan	14	6	42.9
阿坝 Aba	15	7	46.7
南充 Nanchong	9	2	22.2
乐山 Leshan	14	7	50.0
遂宁 Suining	2	0	0.0
泸州 Luzhou	4	3	75.0
攀枝花 Panzhihua	5	2	40.0
总计 Total	431	134	31.1

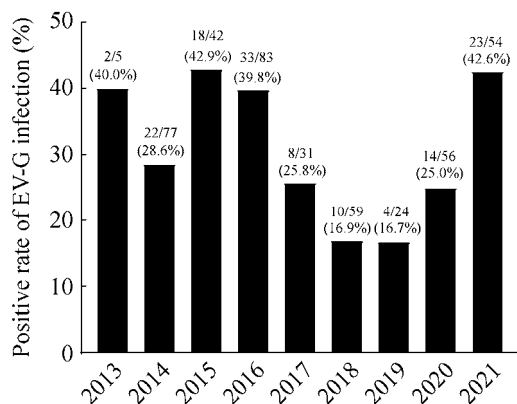


图8 四川省 2013–2021 年 EV-G 阳性率

Figure 8 EV-G positive rate in Sichuan province from 2013 to 2021.

3 讨论与结论

近年来, 规模养殖场猪病错综复杂, 混合感染导致疫病的临床症状复杂多样, 临床诊断猪病难度增加。EV-G 是一种常见的猪肠道病原体, 在猪病临床病料中可经常检测到该病毒, 同时发现 EV-G 常与其他病毒混合感染^[23]。EV-G 引起的疾病临床症状多种多样, 与其他多种疾病有相似之处, 难以从临床上进行判断, 因此亟须建立一种效果更好的实验室诊断方法。随着分子诊断技术的发展, RT-qPCR 已被广泛应用于病原检测。杨春杰等^[17]根据 EV-G 3D 基因保守区域设计引物, 建立了 EV-G RT-qPCR 检测方法。EV-G 的突变率高导致其各个基因型间差异非常大, 本研究前期将 EV-G 进行多序列比对, 发现 3'UTR 最保守, 其次是 5'UTR 基因, 由于 3'UTR 核苷酸序列过短, 因此本研究选择 5'UTR 基因的高度保守片段设计 RT-qPCR 引物, 可通用于检测 EV-G 多种基因型。本研究建立的 RT-qPCR 结果表明, 质粒浓度在 1.89×10^2 – 1.89×10^8 copies/ μ L 时, 该方法扩增效率 $E=1.96$, 相关系数 $R^2=0.996$; 熔解曲线为尖锐单峰, 表明该方法无非特异性扩增; 本方法检测 PDCoV、PEDV、TGEV、JEV、PSV、PCV、PPV、PRV 和 PRRSV 核酸均为阴性, 表明其特异性好, 不存在交叉反应; 本研究建立的 RT-qPCR 与普通 PCR 比较, 其检测下限可达 1.89×10^1 μ L, 比普通 PCR 灵敏 10 倍; 组内重复

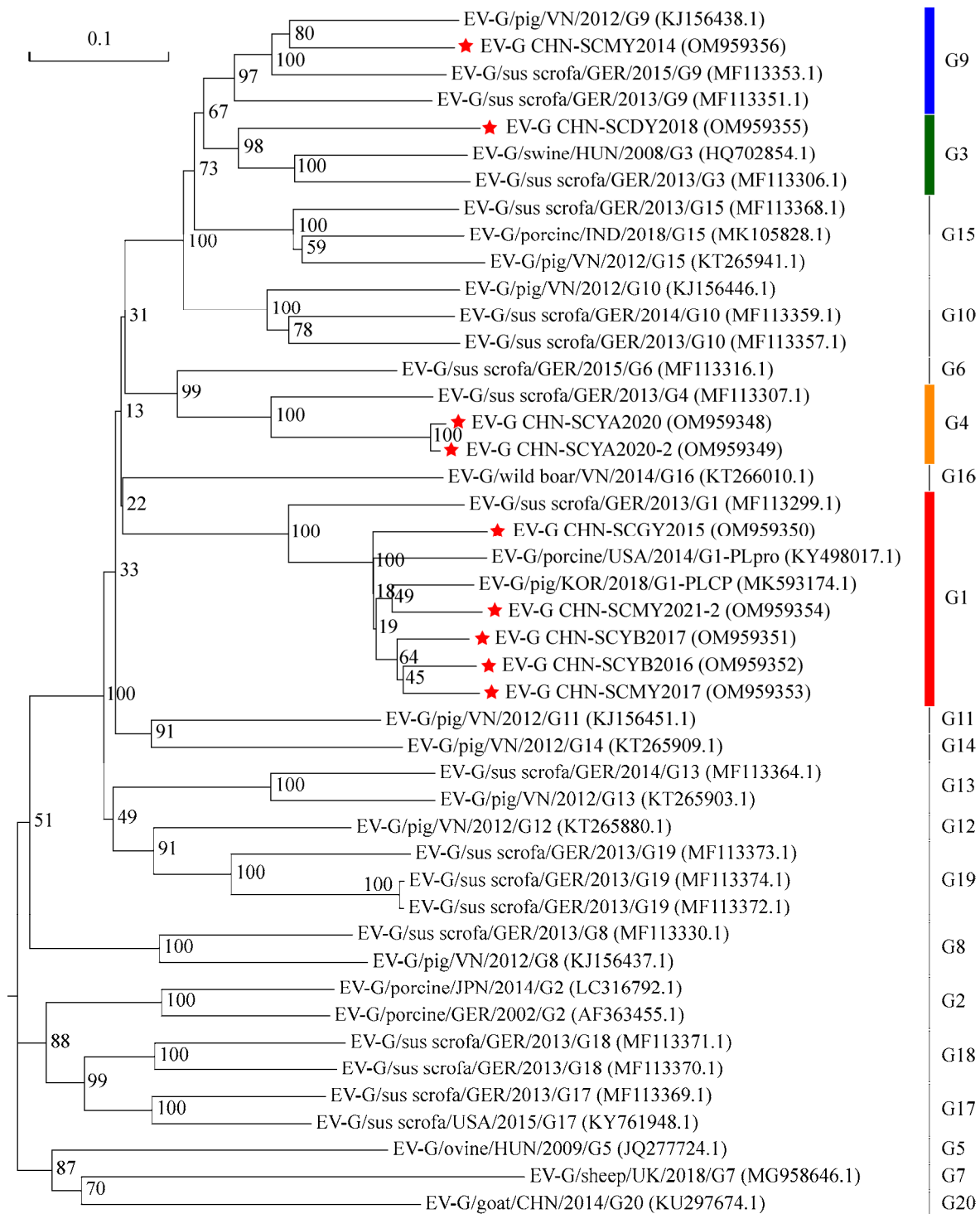


图 9 九株 EV-G 毒株 *VPI* 基因序列系统发育分析 各毒株括号内序号为 GenBank 登录号; 分支节点上的数字代表该分支的可信度; 距离标尺代表序列间差异数值的单位长度

Figure 9 Phylogenetic analysis of *VPI* gene nucleotide sequence of nine EV-G strains. The number in the brackets of each strain is the GenBank accession number; The number on the branch node represents the reliability of the branch; The scale bars indicate nucleotide substitutions at each site.

试验和组间重复试验变异系数分别为 0.06%–0.15%和 0.30%–1.29%，表明该方法均有很好的稳定性和重复性。

四川地区先前未有关于 EV-G 的相关报道，本研究应用建立的 RT-qPCR 方法对四川部分地区 2013–2021 年的 431 份猪场腹泻样本进行检测，统计 EV-G 阳性率，并调查 EV-G 在四川部分地区以及不同年份的流行情况，进一步丰富我国 EV-G 流行病学调查相关数据。四川地区 EV-G 总阳性率为 31.1% (134/431)，与国内已报道的其他地区 EV-G 流行情况相比，阳性率较高。从地域和时间分布来看，EV-G 检出率差别不大，表明 EV-G 在四川地区猪群中已感染非常普遍且时间较长。

VP1 蛋白是 EV-G 的主要结构蛋白之一，在形成病毒粒子时 VP1 位于病毒的表面，是形成病毒抗原表位的主要部分^[1]。EV-G 的基因型分型主要依据结构蛋白 VP1 的基因序列差异^[11,15]，目前可划分为 20 种基因型。本研究挑选来自 7 个不同年份、5 个不同地区的 9 份临床 EV-G 阳性样本，扩增其 VP1 基因并测序，构建系统发育进化树，结果发现其中有 5 株 EV-G 聚类于 EV-G1 分支，分别为 EV-G CHN-SCGY2015 (OM959350)、EV-G CHN-SCYB2016 (OM959352)、EV-G CHN-SCYB2017 (OM959351)、EV-G CHN-SCMY2017 (OM959353)和 EV-G CHN-SCMY2021-2 (OM959354)，初步证明四川地区主要流行的基因型为 EV-G1，此外，还存在 EV-G3、EV-G4 和 EV-G9 多种基因型，是否还有其他基因型的存在则需要继续对阳性临床样本进行测序分析。目前，我国关于 EV-G 的报道总体偏少，以往文献报道的基因型较单一，包括 EV-G1^[21,24-25]和 EV-G2^[18]，且 EV-G1 居多。同样，本研究中 EV-G1 为四川的主要流行毒株，除此之外还检测到多种基因型，这表明 EV-G

在我国猪群存在多基因型感染的现状。EV-G 的基因型流行情况在多个国家和地区均有报道，越南的一项研究表明在 EV-G 检测中 EV-G1 最为流行，其次是 EV-G6^[10]；而德国，EV-G9 在被检出的样本中所占比例最大^[26]；泰国的研究报告显示 EV-G3 为主要流行毒株^[15]；日本对 EV-G 的基因多样性研究较多，发现的基因型包括 G1、G2、G3、G4、G6、G8、G9、G10、G11、G12、G14、G17 等^[4]。EV-G 作为猪群中普遍存在的一种病毒，多基因型表明该病毒仍在不断地发展变化当中，其传播应引起广泛关注，EV-G 在猪群疾病中扮演什么角色仍需深入调查和研究。

综上所述，本研究建立了检测 EV-G 的通用 RT-qPCR 方法，流行病学调查显示四川 2013–2021 年 EV-G 总体阳性率为 31.1%，VP1 序列分析表明四川存在多种 EV-G 的基因型，但优势基因型为 EV-G1。

REFERENCES

- [1] Zell R, Delwart E, Gorbalenya AE, Hovi T, King AMQ, Knowles NJ, Lindberg AM, Pallansch MA, Palmenberg AC, Reuter G, et al. ICTV virus taxonomy profile: picornaviridae[J]. *The Journal of General Virology*, 2017, 98(10): 2421–2422
- [2] Van Dung N, Anh PH, Van Cuong N, Hoa NT, Carrique-Mas J, Hien VB, Campbell J, Baker S, Farrar J, Woolhouse ME, et al. Prevalence, genetic diversity and recombination of species G enteroviruses infecting pigs in Vietnam[J]. *The Journal of General Virology*, 2014, 95(Pt 3): 549–556
- [3] Hammerschmitt ME, De Almeida PR, De Cecco BS, Lorenzetti MP, Schwertz CI, Da Cruz RAS, Caprioli RA, Schuh DT, Demoliner M, Eisen AKA, et al. Swine poliomyelitis in Brazil: identification of teschovirus A, sapelovirus A, and enterovirus G in a farm from southern Brazil[J]. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2021, 52(3): 1617–1622
- [4] Tsuchiaka S, Naoi Y, Imai R, Masuda T, Ito M, Akagami

- M, Ouchi Y, Ishii K, Sakaguchi S, Omatsu T, et al. Genetic diversity and recombination of enterovirus G strains in Japanese pigs: high prevalence of strains carrying a papain-like cysteine protease sequence in the enterovirus G population[J]. *PLoS One*, 2018, 13(1): e0190819
- [5] Lee S, Lee C. First detection of novel enterovirus G recombining a torovirus papain-like protease gene associated with diarrhoea in swine in South Korea[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2019, 66(2): 1023-1028
- [6] Knutson TP, Velayudhan BT, Marthaler DG. A porcine enterovirus G associated with enteric disease contains a novel papain-like cysteine protease[J]. *The Journal of General Virology*, 2017, 98(6): 1305-1310
- [7] Shang PC, Misra S, Hause B, Fang Y. A naturally occurring recombinant enterovirus expresses a torovirus deubiquitinase[J]. *Journal of Virology*, 2017, 91(14): e00450-e00417
- [8] Knowles NJ. Isolation and identification of porcine enteroviruses in great Britain, 1979 to 1980[J]. *The British Veterinary Journal*, 1983, 139(1): 19-22
- [9] Anbalagan S, Hesse RA, Hause BM. First identification and characterization of porcine enterovirus G in the United States[J]. *PLoS One*, 2014, 9(5): e97517
- [10] Lu L, Van Dung N, Bryant JE, Carrique-Mas J, Van Cuong N, Anh PH, Rabaa MA, Baker S, Simmonds P, Woolhouse ME. Evolution and phylogeographic dissemination of endemic porcine picornaviruses in Vietnam[J]. *Virus Evolution*, 2016, 2(1): vew001
- [11] Nagata A, Sekiguchi Y, Oi T, Sunaga F, Madarame H, Imai R, Sano K, Katayama Y, Omatsu T, Oba M, et al. Genetic diversity of enterovirus G detected in faecal samples of wild boars in Japan: identification of novel genotypes carrying a papain-like cysteine protease sequence[J]. *The Journal of General Virology*, 2020, 101(8): 840-852
- [12] Moon HJ, Song D, Seon BH, Kim HK, Park SJ, An DJ, Kim JM, Kang BK, Park BK. Complete genome analysis of porcine enterovirus B isolated in Korea[J]. *Journal of Virology*, 2012, 86(18): 10250
- [13] Yang SX, Wang Y, Shen Q, Zhang W, Hua XG. Prevalence of porcine enterovirus 9 in pigs in middle and Eastern China[J]. *Virology Journal*, 2013, 10: 99
- [14] Sawant PM, Atre N, Kulkarni A, Gopalkrishna V. Detection and molecular characterization of porcine enterovirus G15 and teschovirus from India[J]. *Pathogens and Disease*, 2020, 78(5): ftaa039
- [15] Janetanakit T, Chaiyawong S, Charoenkul K, Tangwangvivat R, Chamsai E, Udom K, Jairak W, Amonsin A. Distribution and genetic diversity of enterovirus G (EV-G) on pig farms in Thailand[J]. *BMC Veterinary Research*, 2021, 17(1): 277
- [16] Vilar MJ, Peralta B, García-Bocanegra I, Simon-Grifé M, Bensaid A, Casal J, Segalés J, Pina-Pedrero S. Distribution and genetic characterization of enterovirus G and *Sapelovirus A* in six Spanish swine herds[J]. *Virus Research*, 2016, 215: 42-49
- [17] 杨春杰, 米雪, 刘雪婷, 蹇慧, 刘芳, 陈樱, 韦祖樟, 黄伟坚, 欧阳康. 猪肠病毒 G 型实时定量 PCR 检测方法的建立及初步应用[J]. *中国兽医科学*, 2020, 50(5): 563-569
- Yang CJ, Mi X, Liu XT, Jian H, Liu F, Chen Y, Wei ZZ, Huang WJ, Ouyang K. Establishment and preliminary application of real-time quantitative PCR assay for the detection of porcine enterovirus G[J]. *Chinese Veterinary Science*, 2020, 50(5): 563-569 (in Chinese)
- [18] 李安琪. 猪肠病毒 RT-PCR 方法的建立和一株野猪肠病毒全基因组分析以及抗 PEDV 变异株卵黄抗体的制备[D]. 南昌: 江西农业大学硕士学位论文, 2017
- Li AQ. The establishment of RT-PCR for detection of porcine enterovirus and the complete genome sequencing and preparation of egg yolk antibody against PEDV variant strain[D]. Nanchang: Master's Thesis of Jiangxi Agricultural University, 2017 (in Chinese)
- [19] Nix WA, Oberste MS, Pallansch MA. Sensitive, seminested PCR amplification of VP1 sequences for direct identification of all enterovirus serotypes from original clinical specimens[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2006, 44(8): 2698-2704
- [20] Stäubli T, Rickli CI, Torgerson PR, Fraefel C, Lechmann J. Porcine teschovirus, sapelovirus, and enterovirus in Swiss pigs: multiplex RT-PCR investigation of viral frequencies and disease association[J]. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 2021, 33(5): 864-874
- [21] Mi X, Yang CJ, Lu Y, Wang HJ, Qin QY, Chen RL, Chen ZK, Luo YY, Chen Y, Wei ZZ, et al. Isolation, identification, and evaluation of the pathogenicity of a porcine enterovirus G isolated from China[J]. *Frontiers*

- in *Veterinary Science*, 2021, 8: 712679
- [22] Cortey M, Díaz I, Vidal A, Martín-Valls G, Franzo G, Gómez De Nova PJ, Darwich L, Puente H, Carvajal A, Martín M, et al. High levels of unreported intraspecific diversity among RNA viruses in faeces of neonatal piglets with diarrhoea[J]. *BMC Veterinary Research*, 2019, 15(1): 441
- [23] 龙凤, 李剑锋, 钟莲, 吴雨殊, 黄丽非, 秦桂清, 王贺杰, 陈樱, 韦祖樟, 黄伟坚, 等. 一例猪流行性腹泻病毒与猪肠道病毒 9 型、猪嗜病毒混合感染的诊断与分析[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2019(18): 74-76, 183
Long F, Li JF, Zhong L, Wu YS, Huang LF, Qin GQ, Wang HJ, Chen Y, Wei ZZ, Huang WJ, et al. Diagnosis and analysis of a case of mixed infection of porcine epidemic diarrhea virus with porcine enterovirus 9 and porcine kobuvirus[J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2019(18): 74-76, 183 (in Chinese)
- [24] 杨春杰, 刘雪婷, 米雪, 陈樱, 韦祖樟, 黄伟坚, 欧阳康. 广西地区猪肠病毒 G 型的流行病学调查及 VP1 基因序列分析[J]. *中国畜牧兽医*, 2020, 47(4): 1216-1224
Yang CJ, Liu XT, Mi X, Chen Y, Wei ZZ, Huang WJ, Ouyang K. Epidemiological investigation and *VP1* gene sequence analysis of porcine enterovirus type G in Guangxi[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2020, 47(4): 1216-1224 (in Chinese)
- [25] Ren LP, Zhang W, Yang SX, Shen Q, Fan KZ, Hua XG. Sequencing of a porcine enterovirus strain prevalent in swine groups in China and recombination analysis[J]. *Veterinary Microbiology*, 2012, 159(1/2): 265-268
- [26] Bunke J, Receveur K, Oeser AC, Fickenscher H, Zell R, Krumbholz A. High genetic diversity of porcine enterovirus G in Schleswig-Holstein, Germany[J]. *Archives of Virology*, 2018, 163(2): 489-493