

PDCoV、SADS-CoV 与 SVA 三重 RT-PCR 检测方法的建立与应用

陈见兴^{1,2}, 王豪杰³, 潘喻², 刘弘毅², 林欢², 朱良全³, 陈洪岩², 谢金鑫¹, 夏长友², 张贺^{*2}, 王玉娥^{*2}

1 新疆农业大学动物医学学院, 新疆 乌鲁木齐 830052

2 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

3 中国兽医药品监察所, 北京 102600

陈见兴, 王豪杰, 潘喻, 刘弘毅, 林欢, 朱良全, 陈洪岩, 谢金鑫, 夏长友, 张贺, 王玉娥. PDCoV、SADS-CoV 与 SVA 三重 RT-PCR 检测方法的建立与应用[J]. 微生物学通报, 2023, 50(12): 5439-5448.

CHEN Jianxing, WANG Haojie, PAN Yu, LIU Hongyi, LIN Huan, ZHU Liangquan, CHEN Hongyan, XIE Jinxin, XIA Changyou, ZHANG He, WANG Yu'e. Establishment and application of a triplex RT-PCR method for detection of PDCoV, SADS-CoV, and SVA[J]. Microbiology China, 2023, 50(12): 5439-5448.

摘要: 【背景】猪丁型冠状病毒(porcine deltacoronavirus, PDCoV)、新型猪急性腹泻综合征冠状病毒(swine acute diarrhea syndrome coronavirus, SADS-CoV)与塞内卡病毒 A 型(seneca virus A, SVA)均为猪的新发病原, 严重危害养猪业的发展。猪感染这 3 种新发病原难以根据临床症状诊断, 因此亟须建立多重反转录-聚合酶链式反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)检测方法对疑似患病猪进行快速诊断, 以降低经济损失。【目的】建立能同时检测 PDCoV、SADS-CoV 和 SVA 单一或混合感染的三重 RT-PCR 检测方法。【方法】参考 GenBank 中登录的 PDCoV 和 SADS-CoV N 基因、SVA L/P1 基因保守区域序列设计 3 对特异性引物, 以温度梯度 PCR 法确定最适退火温度(T_m); 采用阵法优化其引物浓度; 构建重组质粒 PMD-PDCoV、PMD-SADS-CoV 和 PMD-SVA 作为标准品确定最小检测量; 以猪传染性胃肠炎病毒、猪流行性腹泻病毒、猪繁殖和呼吸综合征病毒等 6 种常见感染猪的病毒核酸样本为模板, 确定三重 RT-PCR 法的特异性; 以批间和批内试验验证其重复性; 经检测临床样本并与已报道的检测方法进行比较, 评估其临床应用效果。【结果】建立的三重 RT-PCR 检测方法最佳退火温度为 58.3 °C, 引物最佳浓度分别为 0.50、0.25 和 0.25 $\mu\text{mol/L}$; 其敏感性高, PMD-PDCoV、PMD-SADS-CoV 与 PMD-SVA 最低检测限分别为 1、1 和 10 copies/ μL ; 其特异性强, 仅对 PDCoV、SADS-CoV 和 SVA 有特异性条带, 对其他病毒均无扩增条带; 该方法重复性好, 批间和批内试验检测结果均一致。最后经临床样本检测 PDCoV、

资助项目: 国家重点研发计划青年科学家项目(2021YFF0703100)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China for Young Scientist (2021YFF0703100).

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

Received: 2023-07-17; Accepted: 2023-09-06; Published online: 2023-10-07

SADS-CoV 和 SVA 的阳性率分别为 4.4%、0%和 0.73%，与已报道的检测方法一致。【结论】建立了一种能够同时快速检测 PDCoV、SADS-CoV 和 SVA 的三重 RT-PCR 方法，为临床上检测上述 3 种病毒提供了技术支撑。

关键词：猪丁型冠状病毒；新型猪急性腹泻综合征冠状病毒；塞内卡病毒 A 型；三重 RT-PCR

Establishment and application of a triplex RT-PCR method for detection of PDCoV, SADS-CoV, and SVA

CHEN Jianxing^{1,2}, WANG Haojie³, PAN Yu², LIU Hongyi², LIN Huan², ZHU Liangquan³, CHEN Hongyan², XIE Jinxin¹, XIA Changyou², ZHANG He^{*2}, WANG Yu'e^{*2}

1 College of Veterinary Medicine, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, Xinjiang, China

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

3 China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 102600, China

Abstract: [Background] Porcine deltacoronavirus (PDCoV), swine acute diarrhea syndrome coronavirus (SADS-CoV), and senecavirus A (SVA) are emerging pathogens which seriously endanger the development of the pig industry. The clinical symptoms of pigs infected with the three pathogens are difficult to be distinguished. Therefore, it is urgent to establish a multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) method for the rapid diagnosis of suspected pigs and reduce economic losses. **[Objective]** To establish a triplex RT-PCR method for simultaneous detection of single or mixed infection of PDCoV, SADS-CoV, and SVA. **[Methods]** Three pairs of specific primers were designed according to the conserved regions of the N genes of PDCoV and SADS-CoV and the L/P1 genes of SVA registered in GenBank, and the optimal annealing temperature (T_m) was determined by the temperature gradient PCR method. The primer concentration was optimized by the array method. The recombinant plasmids PMD-PDCoV, PMD-SADS-CoV, and PMD-SVA were constructed as standards to determine the limits of detection (LODs). The specificity of the triplex RT-PCR method was determined with the nucleic acid samples of six common pig viruses including porcine transmissible gastroenteritis virus, porcine epidemic diarrhea virus, and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. The repeatability of the established method was verified by inter-batch and intra-batch tests. Finally, we employed the triplex PCR method to detect the clinical samples and compared the results with those obtained with the reported detection methods, thus evaluating the clinical application performance of this method. **[Results]** The optimal T_m was 58.3 °C, and the optimal primer concentrations were 0.50, 0.25, and 0.25 $\mu\text{mol/L}$, respectively. The established method had high sensitivity, with the LODs of 1, 1, and 10 copies/ μL for PMD-PDCoV, PMD-SADS-CoV, and PMD-SVA, respectively. It had strong specificity, with specific bands only for PDCoV, SADS-CoV, and SVA and no bands for other viruses. Moreover, the method had good repeatability as the test results were consistent between and within batches. Finally, the positive rates of PDCoV, SADS-CoV, and SVA in the clinical

samples detected by the established method were 4.4%, 0%, and 0.73%, respectively, which were consistent with the results obtained with the reported detection methods. **[Conclusion]** The triplex RT-PCR method established in this study is accurate and reliable for the simultaneous detection of PDCoV, SADS-CoV, and SVA in clinical samples.

Keywords: porcine deltacoronavirus (PDCoV); swine acute diarrhea syndrome coronavirus (SADS-CoV); seneca virus A (SVA); triplex reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

猪丁型冠状病毒(porcine deltacoronavirus, PDCoV)和新型猪急性腹泻综合征冠状病毒(swine acute diarrhea syndrome coronavirus, SADS-CoV)均属于冠状病毒科,作为近年来猪的新发病原,可引起仔猪腹泻、呕吐甚至严重脱水死亡,临床症状与猪流行性腹泻病毒(porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)和猪传染性胃肠炎病毒(transmissible gastroenteritis virus, TGEV)相似,难以根据临床症状进行快速诊断^[1-2]。塞内卡病毒 A 型(seneca virus A, SVA)属于小 RNA 病毒科塞内卡病毒属唯一的成员,可引起患病猪嗜睡、厌食、跛行及某些器官产生水疱样病变甚至死亡,临床症状与口蹄疫、猪水疱病和水疱性口炎等引起水疱症状的病原相似,难以通过临床症状进行区分^[3-4]。PDCoV、SADS-CoV 和 SVA 均为猪的新发病原,无季节特异性和年龄特异性,但具有较高的感染率和死亡率,这 3 种新发病原均为 RNA 病毒,结构简单,具有较高的突变率^[5]。有研究表明 PDCoV 和 SADS-CoV 分别可能由鸟类和蝙蝠突变而来^[6-7], SVA 可感染牛、苍蝇和老鼠^[8],说明这些新发病原具有跨物种传播的风险和广泛流行的可能。目前,一些国家均有相关病例的报道^[9-10],每次暴发均对各国的生猪健康和经济造成很大的影响。

目前国内外已报道的方法中仅有少数几个相关病原的单重或双重反转录-聚合酶链式反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)方法的建立,尚未见可同时检测

PDCoV、SADS-CoV 与 SVA 这 3 种新发病原的多重 RT-PCR 方法,其中曾秀秀等^[11]建立的多重 RT-PCR 方法中虽然包含 PDCoV 和 SADS-CoV 的检测,但最低检测拷贝数分别仅为 1×10^6 copies/ μ L 和 1×10^4 copies/ μ L,灵敏度不高。其他单重 RT-PCR 的检测方法虽然灵敏度高,但仅能检测单一病原,操作烦琐且极易漏检,存在一定的局限性。因此,本研究通过序列比对分析确定 PDCoV、SADS-CoV 和 SVA 的特异性检测靶基因,设计 3 对特异性引物并建立一种能够同时快速检测此 3 种病毒的 RT-PCR 方法,以期为新发病原的流行病学调查和临床诊断提供灵敏和可靠的技术手段。

1 材料与方法

1.1 病毒基因组和病料

新型猪急性腹泻综合征冠状病毒(swine acute diarrhea syndrome coronavirus, SADS-CoV)、猪丁型冠状病毒(porcine deltacoronavirus, PDCoV)、塞内卡病毒 A 型(seneca virus A, SVA)、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)、猪伪狂犬病毒(pseudorabies virus, PRV)、猪流感病毒(swine influenza virus, SIV)、猪圆环病毒 2 型(porcine circovirus type 2, PCV2)、猪瘟病毒(classical swine fever virus, CSFV)和猪繁殖与呼吸综合征病毒(porcine reproductive and respiratory syndrome

virus, PRRSV)的基因组均由中国兽医药品监察所惠赠;从不同猪场采集 273 份腹泻病料。

1.2 主要试剂和仪器

2×*Taq* PCR StarMix with Loading Dye, 北京依珊汇通科技有限公司; TIANamp Virus DNA/RNA Kit、EndoFree Maxi Plasmid Kit 和 TIANprep Mini Plasmid Kit, 黑龙江泰康生物科技有限公司; Gel Extraction Kit, 北京索莱宝科技有限公司; *Escherichia coli* DH5 α 感受态细胞, 北京睿博兴科生物技术有限公司; pMD18-T 载体和 PrimeScript™ RT reagent Kit, 宝生物工程(大连)有限公司。梯度 PCR 仪, 北京佰鸥创投生物科技有限公司; 电泳仪, 北京市六一仪器厂; 凝胶成像仪, 上海天能科技有限公司。

1.3 引物合成和设计

参照 GenBank 中登录的 PDCoV N 基因(MN942260)、SADS-CoV N 基因(MN368598)和 SVA L/P1 基因(MN700930)序列, 利用 Primer 5.0 软件设计 3 对特异性引物序列(表 1), 由北京睿博兴科生物技术有限公司合成, 合成后的引物稀释至 10 $\mu\text{mol/L}$, 并保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 备用。

1.4 模板的制备

根据反转录试剂盒说明书将 SADS-COV、

PDCoV、SVA、PEDV、TGEV、CSFV 和 PRRSV 的 RNA 反转录为 cDNA, 于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.5 重组质粒的制备

利用胶回收试剂盒分别回收 SVA 的 L/P1 基因、PDCoV 和 SADS-CoV 的 N 基因的部分保守序列, 与 pMD18-T 载体连接, 构建重组质粒 PMD-PDCoV、PMD-SADS-CoV 和 PMD-SVA, 分别转化至 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 选取阳性克隆菌测序。将测序正确的样品扩大培养后采用质粒提取试剂盒分别提取 PMD-PDCoV、PMD-SADS-CoV 和 PMD-SVA, 用超微量核酸蛋白分析仪测定其浓度并换算为拷贝数, 分别作为三重 RT-PCR 的重组质粒标准品。

1.6 三重 RT-PCR 方法的建立及优化

分别以 PDCoV、SADS-CoV 和 SVA 的 cDNA 为模板, 利用设计的 3 对特异性引物分别进行单一和三重 RT-PCR 扩增。反应体系: 2×*Taq* PCR StarMix 10 μL , 3 对引物分别为 SVA F/R 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 、PDCoV F/R 0.25 $\mu\text{mol/L}$ 和 SADS-CoV F/R 0.25 $\mu\text{mol/L}$, 模板 1 μL , ddH₂O 补足 20 μL 。进一步对退火温度($50\text{--}60\text{ }^{\circ}\text{C}$)和 3 种引物浓度比例进行优化, 优化的方法是控制变量法, 在其他因素保持不变的条件下, 对某一因素的反应条件进行优化, 最终确定三重 RT-PCR 的最佳反应条件。反应条件: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 3 min; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $58.3\text{ }^{\circ}\text{C}$ 40 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 35 s, 35 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min。

1.7 特异性试验

应用优化后的三重 RT-PCR 方法, 以 SADS-CoV、PDCoV、SVA、TGEV、PEDV、PRRSV、SIV、CSFV、PCV2 和 PRV 的 DNA/cDNA 为模板, 分别以三重 RT-PCR 方法的引物, 以及 PEDV、TGEV、PRRSV、SIV、CSFV、PCV2 和 PRV 的单独引物进行 PCR/RT-PCR 扩增, 并使用 1%琼脂糖凝胶电泳检测该方法的特异性。

表 1 三重 RT-PCR 检测引物

Table 1 Primer of the triple RT-PCR

Primer name	Primer sequence (5'→3')	Product size (bp)
SVA-F	TAGTCGTGTCGGTTCTATAGGT AGC	663
SVA-R	TGGCAGTAAAAGTGGTGGTG GGTTG	
PDCoV-F	AACCCCAACAATCCTAAACAT CAGC	501
PDCoV-R	GAGCGCATCCTTAAGTCTCTC ATAG	
SADS-CoV-F	CACTCCAGATCAACAGATTGG TTAT	312
SADS-CoV-R	CGAGACTGTGAACGTGAAGC	

1.8 灵敏性试验

将 1×10^{11} copies/ μL 的重组质粒 PMD-PDCoV、 1×10^{11} copies/ μL 的重组质粒 PMD-SVA 分别稀释为 1×10^{10} copies/ μL 后, 与 1×10^{10} copies/ μL 的重组质粒 PMD-SADS-CoV 等体积混合, 用 ddH₂O 进行 10 倍倍比稀释作为模板, 利用优化后的三重 RT-PCR 方法进行检测, 验证该方法的灵敏性。

1.9 重复性试验

应用建立的三重 RT-PCR 方法进行重复性试验。批内试验: 以 PMD-PDCoV、PMD-SADS-CoV 和 PMD-SVA 为模板进行 PCR 扩增, 每次试验做 3 次重复; 批间试验: 分批提取质粒 PMD-PDCoV、PMD-SADS-CoV 和 PMD-SVA, 等体积混合后, 在相同条件下分别进行 3 次 PCR 扩增, 以评估该方法的重复性和可靠性。

1.10 临床样品检测

从猪场采集粪便样品 273 份, 每份样品取 1–2 g 于 2 mL 离心管中, 加入 PBS 将样品浸没并使用漩涡振荡器充分振荡混匀, 12 000 r/min 离心 3–5 min 取上清, 将上清分别使用 0.22 μm 的滤膜过滤获得病毒原液。根据 TIANamp Virus DNA/RNA Kit 说明书分别提取病毒原液中的基因组, 并利用反转录试剂盒进行反转录, 获得反转录产物。用本研究建立的三重 RT-PCR 方法与此类病原已报道的单重或多重 RT-PCR 检测方法进行比较^[12–14], 以确定该方法的准确性。

2 结果与分析

2.1 重组质粒标准品的鉴定结果

构建重组质粒 PMD-PDCoV、PMD-SADS-CoV 和 PMD-SVA, 利用紫外分光光度计检测 3 种重组质粒浓度分别为 670、719 和 113 $\mu\text{g/mL}$ 。经换算分别为 1.82×10^{11} 、 2.05×10^{11}

和 3.43×10^{10} copies/ μL , 将质粒分别存放于 -20°C 备用。

2.2 单一及三重 RT-PCR 检测的建立

分别以 PDCoV、SADS-CoV 和 SVA 的 cDNA 为模板, 利用设计的 3 对特异性引物, 分别进行单一和三重 RT-PCR 扩增。结果显示, 能够特异性扩增出 PDCoV、SADS-CoV 和 SVA 的目的片段, 阴性对照组无扩增条带(图 1)。将目的条带切胶回收后测序, 结果与预期结果一致。

2.3 三重 RT-PCR 检测方法的优化结果

通过对退火温度和引物浓度进行优化, 确定三重 RT-PCR 的最适反应体系: $2 \times \text{Taqa}$ PCR Mix 10 μL , 引物 PDCoV-F/PDCoV-R、SADS-CoV-F/SADS-CoV-R 和 SVA-F/SVA-R 分别为 0.50、0.25 和 0.25 $\mu\text{mol/L}$, 模板 1 μL , ddH₂O 补足 20 μL 。最适反应条件: 95°C 3 min; 95°C 30 s, 58.3°C 40 s, 72°C 35 s, 35 个循环; 72°C 5 min。结果表明优化后的退火温度及引物浓度能特异性地扩增出目的片段(图 2)。

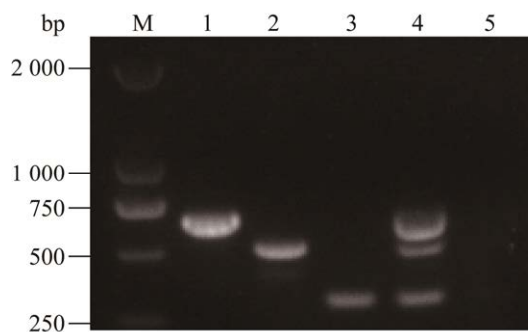


图 1 单重 RT-PCR 和三重 RT-PCR 扩增结果 1–4: SVA L/P1 基因、PDCoV 的 N 基因、SADS-CoV 的 N 基因和多重 RT-PCR 阳性条带; 5: 阴性对照; M: DL2000 DNA Marker

Figure 1 Amplification results of single RT-PCR and triple RT-PCR. 1–4: RT-PCR products of SVA L/P1, PDCoV and SADS-CoV N gene, respectively; 5: Negative control; M: DL2000 DNA Marker.

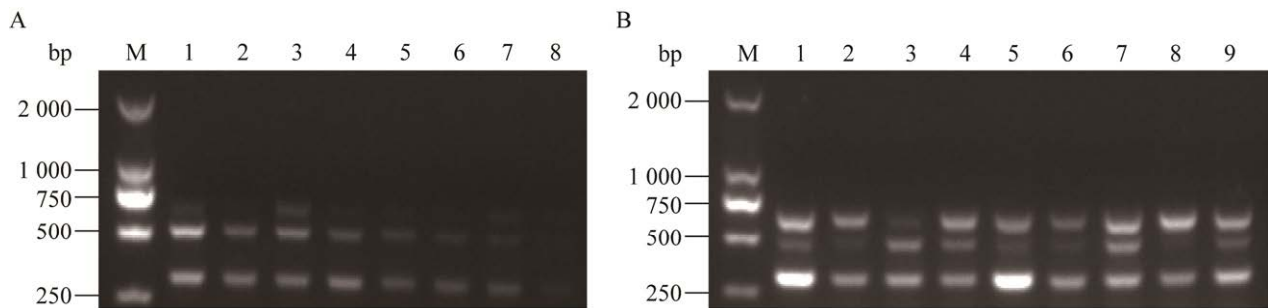


图 2 三重 RT-PCR 退火温度及引物浓度的选择 A: 1–8: 退火温度分别为 60.0、59.4、58.3、56.3、53.9、52.0、50.7 和 50.0 °C; M: DL2000 DNA Marker. B: 1–3: PDCoV 引物为 0.250 $\mu\text{mol/L}$, SADS-CoV 和 SVA 引物分别为 0.250、0.325 和 0.500 $\mu\text{mol/L}$; 4–6: PDCoV 引物为 0.325 $\mu\text{mol/L}$, SADS-CoV 和 SVA 引物为 0.250、0.325 和 0.500 $\mu\text{mol/L}$; 7–9: PDCoV 引物为 0.500 $\mu\text{mol/L}$, SADS-CoV 和 SVA 引物为 0.250、0.325 和 0.500 $\mu\text{mol/L}$; M: DL2000 DNA Marker

Figure 2 Selection of annealing temperature and primer concentration for the triple PCR. A: 1–8: The annealing temperature were 60.0, 59.4, 58.3, 56.3, 53.9, 52.0, 50.7 and 50.0 °C; M: DL2000 DNA Marker. B: 1–3: Concentrations of PDCoV primer was 0.250 $\mu\text{mol/L}$, concentrations of SADS-CoV and SVA primers were 0.250, 0.325 and 0.500 $\mu\text{mol/L}$; 4–6: Concentrations of PDCoV primer was 0.325 $\mu\text{mol/L}$, concentrations of SADS-CoV and SVA primers were 0.250, 0.325 and 0.500 $\mu\text{mol/L}$; 7–9: Concentrations of PDCoV primer was 0.500 $\mu\text{mol/L}$, concentrations of SADS-CoV and SVA primers were 0.250, 0.325 and 0.500 $\mu\text{mol/L}$; M: DL2000 DNA Marker.

2.4 三重 RT-PCR 特异性试验结果

以建立的三重 RT-PCR 方法对 SADS-CoV、PDCoV、SVA、PEDV、TGEV、PRRSV、SIV、CSFV、PCV2 和 PRV 的 DNA/cDNA 进行 PCR 扩增。图 3 结果显示,用三重 RT-PCR 引物扩增含 SVA 等 10 种病原基因组 cDNA 只能扩增出 3 种目的病原的基因,其他病原基因未获得扩增产物。目前扩增出的 PEDV 等病原条带作为阳性对照,阴性对照无特异性条带,表明该方法具有良好的特异性。

2.5 三重 RT-PCR 灵敏性试验结果

将拷贝数 1×10^{11} copies/ μL 的重组质粒 PMD-PDCoV、 1×10^{11} copies/ μL 的重组质粒 PMD-SVA 分别稀释为 1×10^{10} copies/ μL 后,与 1×10^{10} copies/ μL 的重组质粒 PMD-SADS-CoV 等体积混合,然后进行 10 倍倍比稀释作为模板。结果显示, PMD-PDCoV 的检测下限是

1 copies/ μL , PMD-SADS-CoV 的检测下限是 1 copies/ μL 、PMD-SVA 检测下限是 10 copies/ μL (图 4),表明该方法敏感性较高。

2.6 重复性试验结果

利用建立的三重 RT-PCR 检测方法进行批内和批间重复性试验,结果显示该方法扩增条带均一致(图 5),表明该方法具有良好的重复性。

2.7 临床样品检测结果

利用本试验建立的三重 RT-PCR 方法与已报道文献中所使用的引物分别对 273 份临床样品进行检测,结果显示, PDCoV、SADS-CoV 和 SVA 的阳性率分别为 4.4%、0% 和 0.73%。PDCoV 与 SVA 混合感染、PDCoV 与 SADS-CoV 混合感染、SVA 和 SADS-CoV 的阳性率均为 0%,PDCoV、SADS-CoV 和 SVA 混合感染阳性率为 0%,与这 3 种病原已报道的单重或多重 RT-PCR 检测方法的检测结果

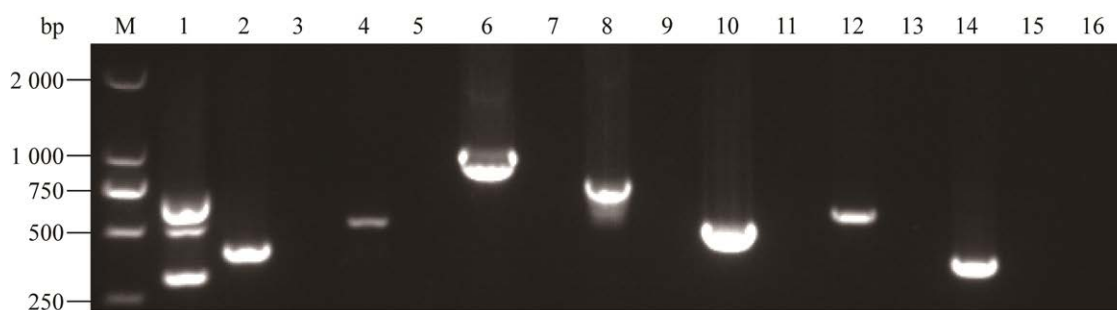


图3 三重 RT-PCR 的特异性试验 1: 采用 SADS-CoV、PDCoV 和 SVA 的引物对 SADS-CoV、PDCoV、SVA、PEDV、TGEV、PRRSV、SIV、CSFV、PCV2 和 PRV 的 DNA/cDNA 混合物进行 RT-PCR 的扩增结果; 2、4、6、8、10、12 和 14: PEDV、TGEV、PRRSV、SIV、CSFV、PCV2 和 PRV 阳性对照; 3、5、7、9、11、13 和 15: 采用 SADS-CoV、PDCoV 和 SVA 的引物分别对 PEDV、TGEV、PRRSV、SIV、CSFV、PCV2 和 PRV 的 DNA/cDNA 进行 RT-PCR 的扩增结果; 16: 阴性对照组; M: DL2000 DNA Marker

Figure 3 Specificity test of the triple RT-PCR. 1: Amplification results of SVA, PDCoV, SADS-CoV, PEDV, TGEV, PRRSV, SIV, CSFV, PCV2, and PRV mixture with primers of SADS-CoV, PDCoV and SVA; 2, 4, 6, 8, 10, 12, and 14: Positive control of PEDV, TGEV, PRRSV, SIV, CSFV, PCV2, and PRV; 3, 5, 7, 9, 11, 13, and 15: Amplification results of PEDV, TGEV, PRRSV, SIV, CSFV, and PCV2 with primers of SADS-CoV, PDCoV and SVA respectively; 16: Negative control; M: DL2000 DNA Marker.

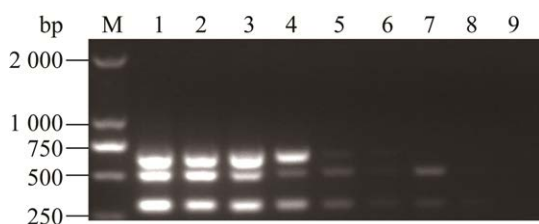


图4 三重 RT-PCR 敏感性试验 1-8: 重组混合质粒浓度分别为 1×10^7 – 1×10^0 copies/ μ L; 9: 阴性对照; M: DL2000 DNA Marker

Figure 4 Sensitivity test of the triple RT-PCR. 1-8: The mixed plasmid concentrations were 1×10^7 – 1×10^0 copies/ μ L, respectively; 9: Negative control; M: DL2000 DNA Marker.

复合率为 100%。表明本研究建立的三重 PCR 方法准确性高, 临床应用性好(表 2)。

3 讨论与结论

随着我国养猪业养殖密度的日益加大, 猪的疫病呈现出多种病原混合感染的态势, 这极大地加快了疫病的传播和变异的速度, 提高了

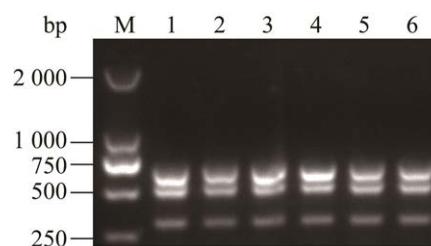


图5 三重 RT-PCR 重复性试验 1-3: 批内重复; 4-6: 批间重复; M: DL2000 DNA Marker

Figure 5 Repeatability test of the triple RT-PCR. 1-3: Intra batch repetition; 4-6: Inter batch repetition; M: DL2000 DNA Marker.

防疫的难度, 是目前养猪业面临的重大挑战。近年来, PDCoV、SADS-CoV 和 SVA 均为猪的新发病原, 具有较强的重组能力和较高的突变率, 导致这些新发病原不具有宿主特异性, 可实现跨宿主传播, 对人类的健康存在潜在的威胁^[15-16]。针对这些新发病原, 很难做到仅通过临床症状进行快速诊断, 还需借助实验室手段才能确诊。

表 2 临床样品检出率

Table 2 Detection rate of clinical samples

Virus	Positive rate (%)		Agreement rate (%)
	Triple PCR methods	Reported PCR detection methods	
PDCoV	4.4 (12/273)	4.4 (12/273)	100
SADS-CoV	0 (0/273)	0 (0/273)	100
SVA	0.73 (2/273)	0.73 (2/273)	100
PDCoV+SVA	0 (0/273)	0 (0/273)	100
PDCoV+	0 (0/273)	0 (0/273)	100
SADS-CoV			
SVA+SADS-CoV	0 (0/273)	0 (0/273)	100
PDCoV+	0 (0/273)	0 (0/273)	100
SADS-CoV+SVA			

PCR 作为分子生物学常用的检测方法之一,因其灵敏性高、特异性强、操作简便等优点而被广泛应用。张帆帆等^[17]根据 PDCoV N 基因设计引物,建立了单重 RT-PCR 检测方法;司广斌等^[12]根据 SADS-CoV N 基因设计引物,建立了单重 RT-PCR 检测方法;范慧等^[14]根据 SVA 保守基因设计引物,建立了单重 RT-PCR 检测方法。与以上方法相比,本研究建立的方法具有可同时检测多种病原且省时等优点。秦秋英等^[18]根据 PDCoV N 基因设计引物和探针,建立了荧光定量 PCR 检测方法;张记宇等^[19]根据 SADS-CoV N 基因设计引物,建立了 SYBR Green 荧光定量 PCR 检测方法;郭振华等^[20]根据 SVA 保守基因 VP1 设计引物,建立了 Taqman 荧光定量 PCR 检测方法。相较以上方法,本研究建立的方法具有操作简便、省时、检测成本低等优点。目前国内外鲜见可同时检测这三种病原的多重 RT-PCR 方法的文献报道。因此亟须建立一种准确性高、敏感性强、重复性好的多重 RT-PCR 方法检测方法,实现对这 3 种新发病原的高效快速诊断,以防止其流行和暴发,并为实验室确诊此类与其他病原临床症状相似

的病原提供有效手段。

本研究针对 SVA 的 L/P1 基因和 PDCoV、SADS-CoV 的 N 基因的保守区域,分别设计了 3 对特异性引物,扩增的目的片段大小分别为 663、501 和 313 bp,相邻片段大小在 100 bp 以上,可在凝胶电泳时比较直观地区分。本研究进一步优化了退火温度和引物浓度等条件,获得了最佳反应条件,建立了一种能同时检测出 PDCoV、SADS-CoV 和 SVA 的多重 RT-PCR 方法,实现了对这 3 种新发病原同时快速诊断的目的。同时,本试验建立的方法具有灵敏性高、重复性好和特异性强等特点,能为此类新发病原检测提供准确和可靠的检测结果。利用本研究建立完成的三重 PCR 的方法,对来自不同猪场采集的 273 份临床样品进行了检测,分别检出 PDCoV 阳性率为 4.4%、SADS-CoV 阳性率为 0%、SVA 阳性率为 0.73%,3 种病毒混合感染检出率为 0%,与文献中已报道的引物检测结果一致,表明该方法具有较好的临床应用效果。由于检测样品数目有限,并未有混合阳性样品检出,还需进一步对临床样品进行收集和检测,以进一步丰富临床检测数据并为流行病学调查提供有效资料。

REFERENCES

- [1] 李任峰,卢晓辉,姜金庆,王自良.猪新发冠状病毒研究进展[J].畜牧兽医学报,2020,51(10):2359-2366. LI RF, LU XH, JIANG JQ, WANG ZL. Research advances on porcine emerging coronaviruses[J]. Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences, 2020, 51(10): 2359-2366 (in Chinese).
- [2] WANG QH, VLASOVA AN, KENNEY SP, SAIF LJ. Emerging and re-emerging coronaviruses in pigs[J]. Current Opinion in Virology, 2019, 34: 39-49.
- [3] ZHANG XL, ZHU ZX, YANG F, CAO WJ, TIAN H, ZHANG KS, ZHENG HX, LIU XT. Review of Seneca valley virus: a call for increased surveillance and research[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 940.

- [4] JOSHI LR, FERNANDES MHV, CLEMENT T, LAWSON S, PILLATZKI A, RESENDE TP, VANNUCCI FA, KUTISH GF, NELSON EA, DIEL DG. Pathogenesis of Senecavirus A infection in finishing pigs[J]. *Journal of General Virology*, 2016, 97(12): 3267-3279.
- [5] SABIR JSM, LAM TTY, AHMED MMM, LI LF, SHEN YY, ABO-ABA SEM, QURESHI MI, ABU-ZEID M, ZHANG Y, KHIYAMI MA, ALHARBI NS, HAJRAH NH, SABIR MJ, MUTWAKIL MHZ, KABLI SA, ALSULAIMANY FAS, OBAID AY, ZHOU BP, SMITH DK, HOLMES EC, et al. Co-circulation of three camel coronavirus species and recombination of MERS-CoVs in Saudi Arabia[J]. *Science*, 2016, 351(6268): 81-84.
- [6] LAU SKP, WONG EYM, TSANG CC, AHMED SS, AU-YEUNG RKH, YUEN KY, WERNERY U, WOO PCY. Discovery and sequence analysis of four deltacoronaviruses from birds in the middle east reveal interspecies jumping with recombination as a potential mechanism for avian-to-avian and avian-to-mammalian transmission[J]. *Journal of Virology*, 2018, 92(15): e00265-e00218.
- [7] ZHOU P, FAN H, LAN T, YANG XL, SHI WF, ZHANG W, ZHU Y, ZHANG YW, XIE QM, MANI S, ZHENG XS, LI B, LI JM, GUO H, PEI GQ, AN XP, CHEN JW, ZHOU L, MAI KJ, WU ZX, LI D, et al. Fatal swine acute diarrhoea syndrome caused by an HKU₂-related coronavirus of bat origin[J]. *Nature*, 2018, 556(7700): 255-258.
- [8] 黄健强, 吴静波. 猪塞内卡病毒研究进展[J]. *动物医学进展*, 2019, 40(3): 82-88.
HUANG JQ, WU JB. Progress on porcine senecavirus[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2019, 40(3): 82-88 (in Chinese).
- [9] 董建国, 饶丹, 覃燕灵, 王艳午, 张宁, 易本驰, 黄立, 刘纪成, 邓凯伟. 猪德尔塔冠状病毒研究进展[J]. *广东农业科学*, 2019, 46(3): 113-118.
DONG JG, RAO D, QIN YL, WANG YW, ZHANG N, YI BC, HUANG L, LIU JC, DENG KW. Research progress on porcine deltacoronavirus[J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2019, 46(3): 113-118 (in Chinese).
- [10] 廖迎新, 范锦戴, 张梦茹, 刘晨晨, 章洋溢, 孙显月, 陈金顶, 赵明秋. A 型塞内卡病毒研究进展[J]. *中国兽医学报*, 2021, 41(8): 1645-1650, 1657.
LIAO YX, FAN JD, ZHANG MR, LIU CC, ZHANG YY, SUN XY, CHEN JD, ZHAO MQ. Research progress of senecavirus A[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2021, 41(8): 1645-1650, 1657 (in Chinese).
- [11] 曾秀秀, 宋德平, 张帆帆, 李凯, 叶昱, 丁珍, 吴琼, 肖琦, 于振兴, 顾俊, 陈君, 张誉瀚, 曾秀, 何后军, 唐玉新. 三种猪的肠道腹泻冠状病毒三重 RT-PCR 检测方法的建立与应用[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2020(15): 105-109.
ZENG XX, SONG DP, ZHANG FF, LI K, YE Y, DING Z, WU Q, XIAO Q, YU ZX, GU J, CHEN J, ZHANG YH, ZENG X, HE HJ, TANG Y. Establishment and application of triple RT-PCR method for detection of enterodiarrrhea coronavirus in three pigs[J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2020(15): 105-109 (in Chinese).
- [12] 司广斌, 陈志飞, 梁文清, 陈一波, 贺东生. 猪急性腹泻综合征病毒 RT-PCR 检测方法的建立及应用[J]. *中国动物检疫*, 2020, 37(11): 76-81.
SI GB, CHEN ZF, LIANG WQ, CHEN YB, HE DS. Establishment and application of a RT-PCR assay for detection of porcine acute diarrhea syndrome coronavirus[J]. *China Animal Health Inspection*, 2020, 37(11): 76-81 (in Chinese).
- [13] 李莎莎, 纪立凯, 王中华, 陈冈, 严亚贤. 猪 Delta 冠状病毒、猪流行性腹泻病毒、猪传染性胃肠炎病毒、猪轮状病毒多重 PCR 检测方法的建立和应用[J]. *畜牧与兽医*, 2020, 52(9): 74-79.
LI SS, JI LK, WANG ZH, CHEN G, YAN YX. Establishment and application of the multiplex PCR method for detection of PDCoV, PEDV, TGEV and PRoV[J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2020, 52(9): 74-79 (in Chinese).
- [14] 范慧, 李亮, 姜平, 王先炜, 李玉峰, 白娟. 塞内卡病毒 A 的 RT-PCR 检测方法的建立和应用[J]. *畜牧兽医学报*, 2019, 50(6): 1312-1318.
FAN H, LI L, JIANG P, WANG XW, LI YF, BAI J. Establishment and application of a RT-PCR assay for detection of senecavirus A (SVA)[J]. *Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 2019, 50(6): 1312-1318 (in Chinese).
- [15] LIU FX, WANG QQ, HUANG YL, WANG N, SHAN H. A 5-year review of senecavirus A in China since its emergence in 2015[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2020, 7: 567792.
- [16] LIU Q, WANG HY. Porcine enteric coronaviruses: an updated overview of the pathogenesis, prevalence, and diagnosis[J]. *Veterinary Research Communications*, 2021, 45(2/3): 75-86.

- [17] 张帆帆, 宋德平, 周信荣, 黄冬艳, 李安琪, 彭棋, 陈燕君, 吴琼, 何后军, 唐玉新. 新现猪 Delta 冠状病毒 RT-PCR 检测方法的建立及其应用[J]. 中国农业科学, 2016, 49(7): 1408-1416.
ZHANG FF, SONG DP, ZHOU XR, HUANG DY, LI AQ, PENG Q, CHEN YJ, WU Q, HE HJ, TANG YX. Establishment and application of a RT-PCR assay for detection of newly emerged porcine deltacoronavirus[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2016, 49(7): 1408-1416 (in Chinese).
- [18] 秦秋英, 速雪丽, 黄诗婷, 秦毅斌, 何颖, 卢冰霞, 陈樱, 韦祖樟, 黄伟坚, 欧阳康. 猪德尔塔冠状病毒荧光定量 PCR 检测方法的建立与初步应用[J]. 中国兽医科学, 2022, 52(11): 1373-1378.
QIN QY, SU XL, HUANG ST, QIN YB, HE Y, LU BX, CHEN Y, WEI ZZ, HUANG WJ, OUYANG K. Establishment and preliminary application of fluorescence quantitative PCR for detection of porcine deltacoronavirus[J]. *Chinese Veterinary Science*, 2022, 52(11): 1373-1378 (in Chinese).
- [19] 张记宇, 韩郁茹, 时洪艳, 陈建飞, 张鑫, 刘建波, 张燎原, 冯书风, 冯廷帅, 季朝阳, 石达, 冯力. 猪急性腹泻综合征冠状病毒 SYBR Green 荧光定量 PCR 检测方法的建立及应用[J]. 畜牧兽医学报, 2021, 52(10): 2887-2894.
ZHANG JY, HAN YR, SHI HY, CHEN JF, ZHANG X, LIU JB, ZHANG LY, FENG SF, FENG TS, JI ZY, SHI D, FENG L. Establishment and application of SYBR green real-time PCR for swine acute diarrhea syndrome coronavirus[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2021, 52(10): 2887-2894 (in Chinese).
- [20] 郭振华, 阮海宇, 乔松林, 邓瑞广, 张改平. 基于 TaqMan 探针的 A 型塞尼卡病毒荧光定量 RT-PCR 方法的建立及应用[J]. 动物医学进展, 2020, 41(5): 6-12.
GUO ZH, RUAN HY, QIAO SL, DENG RG, ZHANG GP. Establishment and application of A TaqMan-based RT-qPCR assay for detection of senecavirus A[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2020, 41(5): 6-12 (in Chinese).