

杨晓宇, 陈世界, 林 华, 等. 多重 TaqMan 荧光定量 PCR 检测仔猪先天性震颤相关病毒方法的建立与应用[J]. 江苏农业学报, 2020, 36(4): 971-977.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2020.04.023

多重 TaqMan 荧光定量 PCR 检测仔猪先天性震颤相关病毒方法的建立与应用

杨晓宇¹, 陈世界², 林 华², 张 婧², 安 徽², 朱 玲^{1,3}

(1. 四川农业大学动物医学院, 四川 成都 611130; 2. 成都海关检验检疫技术中心, 四川 成都 610041; 3. 四川农业大学动物疫病与人类健康四川省重点实验室, 四川 成都 611130)

摘要: 旨在研究能够快速、准确、灵敏地鉴别、诊断引起仔猪先天性震颤的猪非典型瘟病毒(Atypical porcine pestivirus, APPV)、猪瘟病毒(Classical swine fever virus, CSFV)、猪圆环病毒 3 型(Porcine circoviruses type 3, PCV-3)及猪捷申病毒 1 型(Porcine teschovirus 1, PTV-1)的方法。通过对 GenBank 中登录的 APPV 的 NS3 基因序列、CSFV 的 E2 基因序列、PCV-3 的 ORF2 基因序列和 PTV-1 的 VP1 基因序列进行分析, 设计针对 4 种病毒的特异性引物和 TaqMan 水解探针。通过对反应条件和反应程序进行优化, 拟建立针对仔猪先天性震颤相关病毒的多重 TaqMan 荧光定量 PCR 检测方法。结果显示, 研究得到的多重 TaqMan 荧光定量 PCR 检测方法能够特异性检测 APPV、CSFV、PCV-3 和 PTV-1, 而与其他病原无交叉反应; 该方法对 APPV、CSFV、PCV-3 和 PTV-1 的最低检测量分别为 1 μ l 9.2×10^2 拷贝、48 拷贝、56 拷贝和 17 拷贝。重复性试验结果显示, 组内、组间变异系数均小于 2.10%, 重复性和稳定性较为突出。用该方法对 273 份临床样品进行检测, 结果显示, APPV、CSFV、PTV-1 和 PCV-3 的阳性率分别为 20.5%、2.9%、1.5% 和 10.6%, 其中 APPV、CSFV 二者共同感染的检出率为 1.5%, APPV、PCV-3 二者共同感染的检出率为 4.4%, APPV、PTV-1 二者共同感染的检出率为 1.5%, APPV、CSFV、PCV-3 共同感染的检出率为 1.1%。该检测方法操作简单、耗时短、不易对环境造成污染, 检测结果灵敏、准确, 基于该方法对四川地区仔猪先天性震颤相关病毒共感染情况进行的流行病学调查, 可以为后期研究提供重要的数据基础。

关键词: 猪先天性震颤; 猪非典型瘟病毒; 猪瘟病毒; 猪圆环病毒 3 型; 猪捷申病毒 1 型; 多重 TaqMan 荧光定量 PCR 检测

中图分类号: S852.65⁺1

文献标识码: A

文章编号: 1000-4440(2020)04-0971-07

Establishment and application of multiple TaqMan fluorescence quantitative PCR method for detection of congenital tremor related viruses in piglets

YANG Xiao-yu¹, CHEN Shi-jie², LIN Hua², ZHANG Jing², AN Wei², ZHU Ling^{1,3}

(1. College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China; 2. Chengdu Customs Inspection and Quarantine Technology Center, Chengdu 610041, China; 3. Sichuan Key Laboratory of Animal Diseases and Human Health, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China)

Abstract: The aim of this study was to develop a rapid, accurate and sensitive method for the identification and diagnosis of atypical porcine pestivirus (APPV), classical swine fever virus (CSFV), porcine circovirus type 3 (PCV-3) and porcine teschovirus 1 (PTV-1) that caused congenital tremor in piglets. By analyzing the NS3 gene sequence of APPV, E2 gene sequence of CSFV, ORF2 gene sequence of PCV-3 and VP1 gene sequence of PTV-1 registered in GenBank, specific primers and TaqMan hydrolysis probes for four viruses were designed. Multiple TaqMan

收稿日期: 2020-01-13

基金项目: “十三五”国家重点研发计划项目(2018YFD0501102); 四川省科技支撑计划项目(2018NZ0150); 四川省“十三五”育种攻关计划项目(2016NYZ0052); 国家农业产业技术体系四川兽药创新团队专项(CARS-SVDIP)

作者简介: 杨晓宇(1993-), 男, 山东烟台人, 硕士研究生, 主要从事动物传染病病原分子生物学研究。(E-mail) 1491618529@qq.com

fluorescence quantitative PCR method for detection of congenital tremor related viruses in piglets. By analyzing the NS3 gene sequence of APPV, E2 gene sequence of CSFV, ORF2 gene sequence of PCV-3 and VP1 gene sequence of PTV-1 registered in GenBank, specific primers and TaqMan hydrolysis probes for four viruses were designed. Multiple TaqMan

fluorescence quantitative PCR detection method for congenital tremor related viruses in piglets was established by optimizing the reaction conditions and procedures. The results showed that APPV, CSFV, PCV-3 and PTV-1 could be specifically detected by the obtained multiple TaqMan fluorescence quantitative PCR detection method, without cross-reaction with other pathogens. By using the research method, the minimum detectable amount of APPV, CSFV, PCV-3 and PTV-1 was 9.2×10^2 copies per microlitre, 48.0 copies per microlitre, 56.0 copies per microlitre and 17.0 copies per microlitre, respectively. Results of the repeatability test showed that the coefficients of variation between and within groups were less than 2.10%, and the repeatability and stability were outstanding. The method was used to detect APPV, CSFV, PCV-3 and PTV-1 in 273 clinical samples, the results indicated that the positive rates of APPV, CSFV, PTV-1 and PCV-3 were 20.5%, 2.9%, 1.5% and 10.6%, respectively. In addition, the detection rate of APPV and CSFV co-infection was 1.5%, the detection rate of APPV and PCV-3 co-infection was 4.4%, the detection rate of APPV and PTV-1 co-infection was 1.5%, and the detection rate of APPV, CSFV and PCV-3 joint-infection was 1.1%. The detection method is simple, time-saving and difficult to pollute the environment, and the detection results are sensitive and accurate. An epidemiological investigation of congenital tremor-associated virus infection in piglets of Sichuan area based on this method can provide important data basis for later research.

Key words: congenital tremor; atypical porcine pestivirus; classical swine fever virus; porcine circoviruses type 3; porcine teschovirus 1; multiple TaqMan fluorescence quantitative PCR

近年来,随着中国生猪产业的快速发展,猪常见传染性疾病由过去的单一感染逐渐转变为混合感染,导致猪病的发病率和死亡率居高不下,给临床检测和防控带来了困扰,严重影响了生猪产业的健康发展。仔猪先天性震颤(Congenital tremor, CT)俗称“仔猪抖抖病”^[1],目前尚无有效治疗措施,已经给养猪生产造成了巨大经济损失。其病因可能包括营养因素、遗传因素及病毒性感染因素等。目前,国内研究者已经多次报道,猪非典型瘟病毒(Atypical pestivirus, APPV)、猪瘟病毒(Classical swine fever virus, CSFV)、猪圆环病毒3型(Porcine circoviruses type 3, PCV-3)和猪捷申病毒1型(Porcine teschovirus 1, PTV-1)是引起仔猪先天性震颤的主要病原^[2-5],这些病毒所致疾病在临床上均表现出猪的头部、四肢和尾部发生持续性震颤,有些患病仔猪呈“八”字腿,不能站立行走,对外界刺激较为敏感等。患病仔猪具有运动障碍、吮乳障碍等,最终因饥饿而很快衰竭致死。

目前尚无有效措施防控仔猪先天性震颤,及时确诊是哪一种病毒并加以辅助治疗成为防治该病的关键。实验室现有的大多数抗原检测方法都是对某种病毒的单独检测,操作复杂,无法对引起仔猪先天性震颤的多种病毒进行同时检测。本研究拟建立针对APPV、CSFV、PCV-3、PTV-1的多重TaqMan荧光定量PCR检测方法,旨在高效、灵敏、特异性地对仔猪先天性震颤相关病毒进行区分鉴别,对于猪场防控仔猪先天性震颤相关病毒以及提高出生仔猪的成活

率尤为重要,同时可为临床样本的快速筛检及规模化猪场开展仔猪先天性震颤相关病毒流行病学调查提供快速、可靠的检测方法,并可为仔猪先天性震颤相关病毒性流行病的科学防控提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 病毒与病料

猪繁殖与呼吸综合征病毒(Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)、猪瘟病毒、猪非典型瘟病毒、猪圆环病毒3型、猪捷申病毒1型(PTV-1)、猪流行性腹泻病毒(Porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)、伪狂犬病毒(Pseudorabies virus, PRV)、猪乙型脑炎病毒(Japanese encephalitis virus, JEV)、猪轮状病毒(Rotavirus, RV)均由四川农业大学动物生物技术中心提供并保存;血清采集于四川省各市的规模化养猪场。

1.2 主要试剂

50 bp DNA Ladder 购自天根生化科技(北京)有限公司, Premix Ex Taq (Probe qPCR)、逆转录试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒、pMD19-T 载体、质粒抽提试剂盒等均购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.3 引物的设计及合成

根据 GenBank 中已经登录的病毒基因组信息,选取 APPV NS3 基因、CSFV E2 基因、PCV-3 ORF2 基因和 PTV-1 VP1 基因,用 Prime Express 5.0 软件对上述基因的保守序列进行分析,再设计相应的特异性引物和

探针。在 APPV 探针 5'端标记 FAM 荧光基团,在 3'端标记 MGB 基团;在 CSFV 探针 5'端标记 HEX 荧光基团,在 3'端标记 BHQ1 基团;在 PCV-3 探针 5'端标记 ROX 荧光基团,在 3'端标记 BHQ2 基团;在 PTV-1 探针 5'端标记 CY5 荧光基团,在 3'端标记 BHQ2 基团。APPV/CSFV/PCV-3/PTV-1 引物探针均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,详见表 1。

表 1 APPV/CSFV/PCV-3/PTV-1 引物、探针序列

Table 1 Sequences of primers and probes for APPV/CSFV/PCV-3/PTV-1

引物名称	引物序列 (5'→3')	产物长度 (bp)
APPV-F	GTCAATAAGTTCCTCCACCAAGTCGT	113
APPV-R	ACCTGAAAGGTGCTCCGG	
APPV-P	FAM-ACGCCGATTGATTCTC-MGB	
CSFV-F	AAGGGTGAGTATCAGTACTGTTTGAC	92
CSFV-R	AGTGCTACCACCACCAAGACAA	
CSFV-P	HEX-CTGACCGCCACTCAGATTACTTCG-CA-BHQ1	
PCV-3-F	GAGATGACGTTTCATGCTGGAGTAT	99
PCV-3-R	ACGCCACAGAAGCGCTAT	
PCV-3-P	ROX-CCAGCTGTGGGCCTCTAATGAAT-AGTCTT-BHQ2	
PTV-1-F	CCACCTCCATGACAGCAATG	82
PTV-1-R	TCCTCAATATCTCTGCTTGCTT	
PTV-1-P	CY5-TCAGGGACGAGCGCTACAACTT-TTC-BHQ2	

APPV 表示猪非典型性瘟病毒,CSFV 表示猪瘟病毒,PCV-3 表示猪圆环病毒 3 型,PTV-1 表示猪捷申病毒 1 型。F 表示上游引物,R 表示下游引物,P 表示探针。探针前面的 FAM、HEX、ROX、CY5 为荧光基团,探针后面的 MGB、BHQ1、BHQ2 为淬灭基团。

1.4 重组质粒标准品的制备

使用本试验设计的引物,分别以 APPV、CSFV、PCV-3、PTV-1 的核酸序列为模板,50 μ l 反应体系包括 25.0 μ l 2 \times Taq PCR Master Mix、各 2.5 μ l 上下游引物、5.0 μ l 模板、ddH₂O。PCR 反应程序如下:95 $^{\circ}$ C 4 min;95 $^{\circ}$ C 30 s,APPV 55 $^{\circ}$ C 30 s、PCV-3 55 $^{\circ}$ C 30 s、PTV-1 58 $^{\circ}$ C 30 s、CSFV 60 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 7 min。使用胶回收试剂盒对得到的阳性 PCR 产物进行纯化、连接、转化后,提取阳性质粒。将阳性克隆菌送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序,并对测序结果进行比对。结果表明,4 种阳性重组质粒与试验预期相符。将阳性标准品于-20 $^{\circ}$ C 保存,作为后续试验的阳性模板。

1.5 多重 TaqMan 荧光定量 PCR 检测方法的建立

1.5.1 反应条件的优化 采用宝生物工程(大连)

有限公司的 Premix Ex Taq(Probe qPCR)试剂进行多重 TaqMan 荧光定量 PCR 检测,分别以方法 1.4 中构建的 APPV 质粒、CSFV 质粒、PCV-3 质粒和 PTV-1 质粒为模板,在四者单独优化的基础上,使用矩阵法对 40 μ l 反应体系的混合引物用量、探针用量及退火延伸温度进行进一步优化,以筛选最适的反应体系和反应条件。

1.5.2 标准曲线的制作 取 pMD-APPV、pMD-CSFV、pMD-PCV-3 和 pMD-PTV-1 等 4 种标准质粒,分别进行 10 倍梯度稀释,同时设空白对照,每组 3 个平行重复。用优化后的多重 TaqMan 荧光定量 PCR 体系及扩增程序进行检测,最后建立标准曲线。

1.5.3 特异性试验 用本试验建立的多重 TaqMan 荧光定量 PCR 方法对 APPV、CSFV、PTV-1、PCV-3、RV、PRRSV、JEV、PRV 进行特异性试验,以评价该方法的特异性。

1.5.4 灵敏性试验 分别将 pMD-APPV、pMD-CSFV、pMD-PCV-3 和 pMD-PTV-1 等 4 种重组质粒按 10 倍梯度稀释,再分别选取 1 μ l 10⁵~10⁰ 拷贝的重组质粒作为模板,用本研究建立的多重 TaqMan 荧光定量 PCR 和常规 PCR 方法进行检测,确定检测下限并对 2 种方法的灵敏性进行分析、评价。

1.5.5 重复性试验 在相同条件下,使用已建立的多重 TaqMan 荧光定量 PCR 方法进行 3 次独立的组内、组间重复性试验,用变异系数(CV)来评价方法的重复性。

1.6 临床样品检测

采集来自四川省部分地区规模化猪场的全身震颤的疑似患病仔猪样品(组织器官、血清、精液)273 份,用本试验建立的多重 TaqMan 荧光定量 PCR 方法进行检测,分析相关病毒的共感染情况。

2 结果与分析

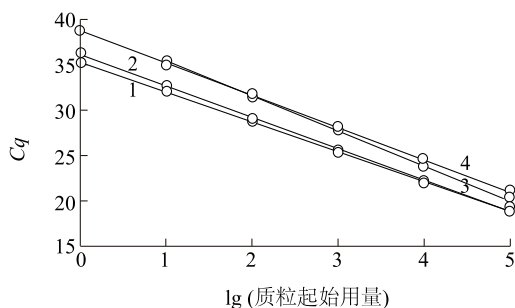
2.1 多重 TaqMan 荧光定量 PCR 方法的建立

将设计并合成好的 4 对引物和探针分别稀释至 10 μ mol/L 的工作浓度,使用矩阵法调节引物用量(0.5 μ l、1.0 μ l、1.5 μ l)、探针用量(0.10 μ l、0.25 μ l、0.50 μ l、1.00 μ l)和退火温度(52.0 $^{\circ}$ C、52.7 $^{\circ}$ C、54.0 $^{\circ}$ C、55.9 $^{\circ}$ C、58.4 $^{\circ}$ C、60.3 $^{\circ}$ C、61.4 $^{\circ}$ C 和 62.0 $^{\circ}$ C)对四重荧光逆转录(RT)PCR 反应条件进行优化。最终确定的 40.00 μ l 四重荧光 RT-PCR 反应体系如下:20 μ l Premix Ex Taq(Probe

qPCR), 各 1.00 μl 4 对上、下游引物, CSFV、PTV-1、PCV-3、APPV 探针用量分别为 0.50 μl 、0.50 μl 、0.25 μl 、0.25 μl , 各 1.00 μl 4 种标准质粒模板, 其余用去离子水补足。得出四重荧光 RT-PCR 的最佳反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s、56 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 40 个循环, 退火阶段收集荧光信号。

2.2 标准曲线的绘制

对 pMD-APPV、pMD-CSFV、pMD-PCV-3 和 pMD-PTV-1 4 种标准质粒进行 10 倍梯度稀释, 按照已优化的反应条件进行检测并建立标准曲线 (图 1), 其中, pMD-APPV 对应的 \lg (质粒起始用量) (x_1) 与扩增循环数 (Y_1) 的线性关系表达式为 $Y_1 = -3.572x_1 + 38.828$, $R_1^2 = 1.000$; pMD-CSFV 对应的 \lg (质粒起始用量) (x_2) 与扩增循环数 (Y_2) 的线性关系表达式为 $Y_2 = -3.358x_2 + 35.587$, $R_2^2 = 0.999$; pMD-PCV-3 对应的 \lg (质粒起始用量) (x_3) 与扩增循环数 (Y_3) 的线性关系表达式为 $Y_3 = -3.521x_3 + 36.361$, $R_3^2 = 0.998$; pMD-PTV-1 对应的 \lg (质粒起始用量) (x_4) 与扩增循环数 (Y_4) 的线性关系表达式为 $Y_4 = -3.838x_4 + 39.813$, $R_4^2 = 0.999$ 。



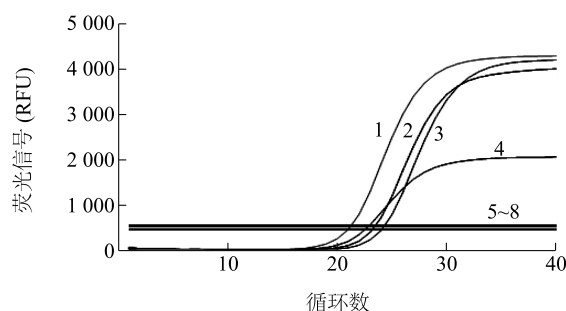
1: pMD-CSFV (猪瘟疫病毒质粒), 2: pMD-PCV-3 (猪圆环病毒 3 型质粒), 3: pMD-PTV-1 (猪捷申病毒 1 型质粒), 4: pMD-APPV (猪非典型瘟病毒质粒)。Cq 表示在 PCR 扩增过程中, 样品扩增荧光信号达到设定阈值时所经历的扩增循环数。

图 1 多重 TaqMan 荧光定量 PCR 标准曲线

Fig.1 Standard curve of multiple TaqMan fluorescence quantitative PCR

2.3 特异性

应用本研究建立的多重 TaqMan 荧光定量 PCR 方法对 APPV、CSFV、PTV-1、PCV-3、RV、PRRSV、JEV、PRV 的基因组进行检测, 结果显示, 仅 APPV、CSFV、PTV-1、PCV-3 出现典型的扩增曲线, 而其他病毒的基因组均未出现扩增曲线 (图 2), 表明该方法具有良好的特异性。



1: PCV-3 (猪圆环病毒 3 型); 2: CSFV (猪瘟疫病毒); 3: APPV (猪非典型瘟病毒); 4: PTV-1 (猪捷申病毒 1 型); 5: RV (猪轮状病毒); 6: PRRSV (猪繁殖与呼吸综合征病毒); 7: JEV (猪乙型脑炎病毒); 8: PRV (伪狂犬病毒)。

图 2 特异性试验结果

Fig.2 Results of the specificity assay

2.4 灵敏性

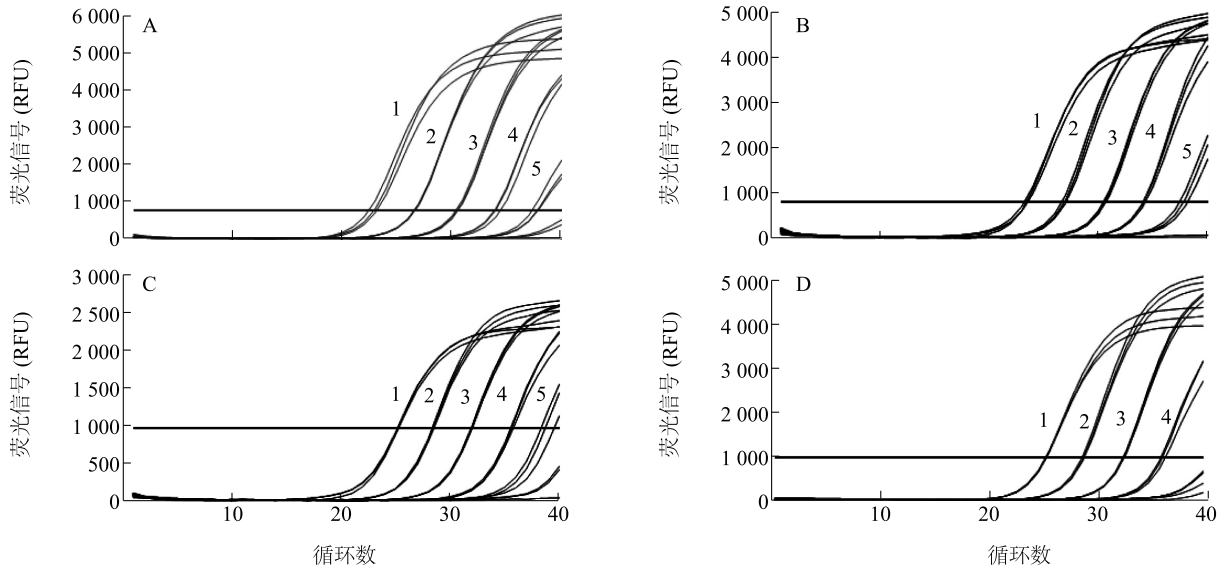
采用本研究已经建立的检测方法对质粒含量为 1 μl $10^0 \sim 10^5$ 拷贝的阳性模板进行 PCR 扩增。如图 3、图 4 所示, 多重 TaqMan 荧光定量 PCR 方法对 CSFV、APPV、PTV-1、PCV-3 的最低检测限依次为 1 μl 48 拷贝、 9.2×10^2 拷贝、17 拷贝、56 拷贝; 常规 PCR 方法对 CSFV、APPV、PTV-1、PCV-3 的最低检测限依次为 1 μl 4.8×10^3 拷贝、 9.2×10^4 拷贝、 1.7×10^3 拷贝、 5.6×10^4 拷贝。对结果进行分析发现, 在对 APPV、CSFV 和 PTV-1 的检测中, 多重 TaqMan 荧光定量 PCR 的最低检测限相较于常规 PCR 提高了 100 倍, 而对 PCV-3 的最低检测限相较于常规 PCR 更是提高了 1 000 倍, 表明本研究所建立的多重 TaqMan 荧光定量 PCR 检测方法比常规 PCR 方法更加灵敏。

2.5 重复性

分别选取 5 个含量的 pMD-APPV、pMD-CSFV、pMD-PCV-3 和 pMD-PTV-1 标准质粒为模板, 进行组内和组间重复试验。表 2 结果显示, APPV、CSFV 的组内重复试验变异系数均小于 1.50%; PCV-3、PTV-1 的组内重复试验变异系数均小于 2.10%; APPV、CSFV 的组间重复试验变异系数均小于 1.00%; PCV-3、PTV-1 的组间重复试验变异系数均小于 1.60%。

2.6 临床样品检测

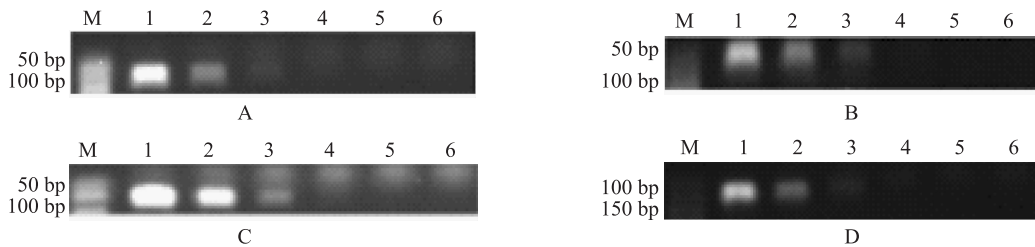
应用本研究建立的多重 TaqMan 荧光定量 PCR 方法对采集的疑似患病仔猪的组织器官、血清、精液等临床样品进行检测。结果显示, APPV



A:PCV-3(猪圆环病毒3型);B:PTV-1(猪捷申病毒1型);C:CSFV(猪瘟病毒);D:APPV(猪非典型瘟病毒);1~5:1 μ l $10^5 \sim 10^1$ 拷贝标准模板的多重 TaqMan 荧光定量 PCR 扩增曲线。

图3 多重 TaqMan 荧光定量 PCR 灵敏性试验结果

Fig.3 Results of sensitivity test by multiple TaqMan fluorescence quantitative PCR



A:PCV-3(猪圆环病毒3型);B:PTV-1(猪捷申病毒1型);C:CSFV(猪瘟病毒);D:APPV(猪非典型瘟病毒);1~6:1 μ l $10^5 \sim 10^0$ 拷贝标准模板的常规 PCR 扩增结果。

图4 常规 PCR 灵敏性试验结果

Fig.4 Results of sensitivity test by common PCR

的检出率为 20.5%(56/273),CSFV 的检出率为 2.9%(8/273),PCV-3 的检出率为 10.6%(29/273),PTV-1 的检出率为 1.5%(4/273)。其中 APPV、CSFV 二者共同感染的检出率为 1.5%(4/273),APPV、PCV-3 二者共同感染的检出率为 4.4%(12/273),APPV、PTV-1 二者共同感染的检出率为 1.5%(4/273),APPV、CSFV、PCV-3 共同感染的检出率为 1.1%(3/273)。临床检测结果显示,APPV 和 PCV-3 的单独感染尤为严重,混合感染类型复杂,给相关疾病的防控带来困难,因此建立高效、灵敏的多重检测方法尤为重要。

3 讨论

本试验建立的多重 TaqMan 荧光定量 PCR 检测方法对 CSFV、APPV、PTV-1、PCV-3 的最低检测限分别为 1 μ l 48 拷贝、 9.2×10^2 拷贝、17 拷贝、56 拷贝,常规 PCR 方法检测 CSFV、APPV、PTV-1、PCV-3 的最低检测限分别为 1 μ l 4.8×10^3 拷贝、 9.2×10^4 拷贝、 1.7×10^3 拷贝、 5.6×10^4 拷贝,其中 APPV、CSFV、PTV-1 的最低检测限均比常规 PCR 方法提高了 100 倍,PCV-3 的最低检测限比常规 PCR 方法提高了 1 000 倍。本试验对采集样品进行检测的结果显示,APPV、CSFV、PTV-1、PCV-3

的检测阳性率分别为 20.5%、2.9%、1.5%、10.6%,其中 APPV、CSFV 共同感染的检出率为 1.5%,APPV、PCV-3 共同感染的检出率为 4.4%,APPV、PTV-1 共同感染的检出率为 1.5%,APPV、CSFV、PCV-3 共同感染的检出率为 1.1%。本研究建立的多重 TaqMan 荧光定量 PCR 检测方法具有良好的灵敏性、特异性和重复性。

表 2 重复性试验结果

Table 2 Results of repeatability tests

病毒	拷贝数 (1 μ l)	变异系数(%)	
		组内	组间
APPV	9.2×10^8	0.66	0.29
	9.2×10^7	0.33	0.24
	9.2×10^6	0.27	0.06
	9.2×10^5	0.11	0.03
	9.2×10^4	0.59	0.11
CSFV	4.8×10^8	1.02	0.25
	4.8×10^7	0.62	0.42
	4.8×10^6	0.58	0.23
	4.8×10^5	0.42	0.46
	4.8×10^4	0.42	0.92
PCV-3	5.6×10^8	0.50	0.47
	5.6×10^7	0.86	1.08
	5.6×10^6	1.73	0.67
	5.6×10^5	0.68	0.37
	5.6×10^4	2.01	0.54
PTV-1	1.7×10^8	0.29	0.17
	1.7×10^7	0.20	0.82
	1.7×10^6	1.81	0.70
	1.7×10^5	0.39	0.31
	1.7×10^4	1.01	1.50

APPV:猪非典型瘟病毒;CSFV:猪瘟病毒;PCV-3:猪圆环病毒 3 型;PTV-1:猪捷申病毒 1 型。

自从 1962 年赵文远等^[6]在中国首次发现仔猪先天性震颤以来,国内外的兽医工作者进行了长时间的研究,但一直无法找到发病的原因。1998 年陆文俊等^[7]、2005 年罗建等^[2]分别使用动物接种试验和免疫荧光染色等方法发现仔猪先天性震颤病例的猪场中存在猪瘟病毒。2005 年 Hause 等^[3]研究证实,APPV 可能是仔猪先天性震颤的病原。随后,全球多个国家先后在农场中检测并发现猪群中有

APPV 的流行^[8-11]。2016–2017 年,Chen 等^[4]使用荧光定量 PCR 方法对中国广西、广东 2 省患仔猪先天性震颤的猪群进行长时间监测,结果发现,仔猪先天性震颤与 PCV-3 感染可能存在联系,受仔猪先天性震颤影响仔猪的 PCV-3 组织嗜性分析结果显示,PCV-3 主要侵害患病动物的脑、心脏,两者的病毒载量较高。2018 年,Possatti 等^[5]使用巢式 PCR 方法首次发现 APPV 与 PTV 混合感染,共同影响新生仔猪,并且二者起到协同作用。仔猪先天性震颤的发病率为 1.8%~35.0%,在没有喝初乳的条件下,患病仔猪的死亡率达到 100.0%。由于尚无有效的治疗措施,因而及时确定病原并加以辅助治疗成为防治该病的关键。目前大多数检测方法都为单重检测,操作复杂,无法对仔猪先天性震颤相关病毒进行同时检测。本研究建立的多重 TaqMan 荧光定量 PCR 检测方法,可以高效、灵敏、特异地对仔猪先天性震颤相关病毒进行区分、鉴别,对于猪场防控仔猪先天性震颤以及提高出生仔猪的成活率尤为重要。基于该方法对四川地区仔猪先天性震颤相关病毒共感染情况进行流行病学调查,可以为该病的防治提供重要的数据基础。

4 结 论

本研究成功建立了灵敏性高、特异性强、耗时短的检测仔猪先天性震颤相关病毒的多重 TaqMan 荧光定量 PCR 方法,实现了对仔猪先天性震颤相关病毒的快速、准确鉴别与诊断。

参考文献:

- [1] 蔡宝祥.家畜传染病学[M].4 版.北京:中国农业出版社,2001:7.
- [2] 罗建,杨小燕,李晓华,等.猪瘟引起仔猪先天性震颤的诊断与防控[J].福建畜牧兽医,2005,27(5):14-15.
- [3] HAUSE B M, COLLIN E A, PEDDIREDDI L, et al. Discovery of a novel putative atypical porcine pestivirus in pigs in the USA[J]. Journal of General Virology, 2015, 96(10):2994.
- [4] CHEN G H, MAI K J, ZHOU L, et al. Detection and genome sequencing of porcine circovirus 3 in neonatal pigs with congenital tremors in South China[J]. Transboundary & Emerging Diseases, 2017, 64(7):1650-1654.
- [5] POSSATTI F, HEADLEY S A, LEME R D A, et al. Viruses associated with congenital tremor and high lethality in piglets[J]. Transboundary & Emerging Diseases, 2018, 65(2):331-337.
- [6] 赵文远,徐福南,罗清生.仔猪先天性肌阵挛病[J].中国畜牧兽医,1962(8):20.

- [7] 陆文俊,王世昌. 猪瘟造成的仔猪先天性震颤[J]. 养猪,1998(1):43.
- [8] POSTEL A, HANSMANN F, BAECHLEIN C, et al. Presence of atypical porcine pestivirus (APPV) genomes in newborn piglets correlates with congenital tremor [J]. Scientific Reports, 2016(6): 27735.
- [9] BEER M, WERNIKE K, DRÄGER C, et al. High prevalence of highly variable atypical porcine pestiviruses found in Germany[J]. Transboundary and Emerging Diseases, 2016, 64(5):e22-e26.
- [10] DE GROOF A, DEIJS M, GUELEN L, et al. Atypical porcine pestivirus: a possible cause of congenital tremor type A-II in newborn piglets[J]. Viruses, 2016, 8(10):271
- [11] ARRUDA B L, ARRUDA P H, MAGSTADT D R, et al. Identification of a divergent lineage porcine pestivirus in nursing piglets with congenital tremors and reproduction of disease following experimental inoculation[J]. PLoS One, 2016, 11(2):e0150104.

(责任编辑:徐 艳)