

猪德尔塔冠状病毒荧光定量 PCR 检测方法的建立

陈小金, 张霞, 王玉玲, 董志珍

(天津海关动植物与食品检测中心, 天津 300456)

摘要: 根据 GenBank 登录的猪德尔塔冠状病毒 (PDCoV) 毒株序列设计特异性引物, 建立了检测 PDCoV 的实时荧光 PCR 方法。该方法在标准品浓度 $2.49 \times 10^8 \sim 2.49 \times 10^2$ copies/ μ L 范围内线性关系良好; 特异性试验显示, 其他几种常见猪病病毒未见典型扩增曲线; 敏感性试验显示, 最低检测下限为 24.9 copies/ μ L; 重复性试验显示, 批内和批间变异系数小于 3%。用该方法检测 62 份猪腹泻粪便样品, 相比常规 PCR 方法, 前者的检出率更高; 两种方法检测 1 168 份进境活猪粪便拭子样品, 结果均为阴性。结果表明, 本研究所建立的方法适用于国内猪场的 PDCoV 的检测和进境活猪的监控检测, 也可作为 PDCoV 的诊断及分子流行病学调查的技术手段。

关键词: 猪德尔塔冠状病毒; 荧光定量 PCR; 腹泻

中图分类号: S855.3 文献标识码: B 文章编号: 1005-944X (2018) 09-0095-06

DOI: 10.3969/j.issn.1005-944X.2018.09.024

Development of Fluorescence Quantitative PCR Assay for Detection of Porcine Deltacoronavirus

Chen Xiaojin, Zhang Xia, Wang Yuling, Dong Zhizhen

(Animal and Plant and Foodstuffs Inspection Center, Tianjin Customs, Tianjin 300456, China)

Abstract: Based on the sequence analysis results of different porcine deltacoronavirus (PDCoV) strains published in GenBank, specific primers were designed, and then a real-time fluorescence quantitative PCR method was established. Results showed that the linear determination range of standards was 2.49×10^8 to 2.49×10^2 copies/ μ L; according to the specificity analysis, the amplifications of other porcine viruses were all negative results; the sensitivity test showed the minimum detection limit was 24.9 copies/ μ L; the repeatability tests showed the intra-assay and inter-assay variable coefficients were less than 3%. Otherwise, 62 fecal samples collected from domestic pig farms were detected by the established and conventional PCR method, and the results indicated the real-time PCR had a higher positive detection rate. Using the two methods to detect 1 168 fecal samples collected from imported pigs, all test results were negative. As a conclusion, the method established in this study is not only suitable for PDCoV detection of the clinical samples in domestic pig farms, but also suitable for monitoring and detecting of live pigs imported from foreign countries. Also, the method would provide an effective method for diagnosis and molecular epidemiological investigation of PDCoV.

Key words: porcine deltacoronavirus; real-time fluorescence quantitative PCR; diarrhea

腹泻是影响猪群生产的一种常见的多发性疾病。引起腹泻的病原多而复杂, 其中猪传染性胃炎病毒、猪流行性腹泻病毒、猪轮状病毒是目前常见仔猪腹泻病毒性病原^[1-2]。2013年张志等^[3]对我国

基金项目: 国家质量监督检验检疫总局科技计划项目 (2016IK249)

通信作者: 董志珍

5省份的部分规模猪场开展研究, 发现猪场的腹泻流行率达71.99%。2014年美国23个州暴发了2 692起腹泻疫情。其他国家, 如德国、法国、瑞士、意大利、韩国、泰国和越南等, 也在近几年相继暴发过腹泻疫情, 造成了严重经济损失^[4-5]。由此可见, 腹泻已成为影响世界养猪业发展的主要疾病之一。而变异毒株和新型病毒的出现更增加了其防控

难度。因而，引起腹泻的相关病毒备受关注，

2014年美国俄亥俄州猪场发生腹泻疫情，临床症状与流行性腹泻相似。调查发现，引起该疫情的病原并非猪流行性腹泻病毒（Porcine epidemic diarrhea virus, PEDV）、猪传染性胃肠炎病毒（Transmissible gastroenteritis virus, TGEV）、猪轮状病毒（Porcine rotavirus, PRoV）和沙门氏菌，经电镜检测最终确定病原为PDCoV^[6]。明尼苏达大学兽医诊断实验室和爱荷华州立大学提交两株PDCoV全基因组序列，检测发现其与Patrick等报道的PDCoV HKU15-155和HKU15-44毒株序列高度同源^[7-9]。2014年4—6月韩国学者从腹泻猪场样本中检出PDCoV，并发现其与我国香港毒株和美国毒株的同源性分别为98.8%~99.0%和99.6%~99.8%^[10]。Marthaler等^[9]对美国部分地区2014年1—2月的猪场样品进行检测，发现PDCoV阳性率为30%，表明PDCoV在美国中东部地区普遍存在；此外，约22%样品是PDCoV单独感染，58%样品为混合感染，其中和PRoV混合感染的比例最大。Ma等^[11]对PDCoV Ohio CVM1毒株进行研究，证实PDCoV可以引起仔猪腹泻、呕吐、脱水等类似猪传染性胃肠炎和流行腹泻的临床症状，同时发现PDCoV能够引起明显的胃部病变以及轻度肺部病变。

目前针对PDCoV检测方法的研究相对较少。少量文献报道已有研究人员建立了RT-PCR、探针法荧光PCR、ELISA检测方法^[9, 12-18]。SYBR Green I 荧光PCR具有操作简便、成本低等优点，可广泛应用于基层实验室。本研究以染料法为基础，建立针对PDCoV的SYBR Green I的荧光定量PCR方法，旨在丰富PDCoV检测技术体系，为进出境活猪病毒性腹泻疫病检测以及防控与预警提供技术手段，为防止外来重要动物疫病传入提供保障，同时为疫苗的评价，以及病原体在动物机体内的动态分布、细胞培养中的病毒滴度等研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 毒株、细胞系及临床病料

试验中使用的病毒株均为疫苗毒，包括猪流行性腹泻病毒（Porcine epidemic diarrhea virus, PEDV）、猪轮状病毒（Porcine rotavirus, PoRV）、猪传染性胃肠炎病毒（Transmissible

gastroenteritis virus, TGEV）、猪瘟病毒（Classical swine fever virus, CSFV）、猪繁殖与呼吸综合征病毒（Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV）。待检样品为2017年收集的国内部分省份猪场腹泻粪便及2017年本实验室收集的进境种猪粪便拭子（源自加拿大和美国）。

1.2 主要试剂及仪器

随机引物：购于Promega公司；pUC19、Premix ExTaq、SYBR Green I 荧光PCR预混液、载体、Easy dilution buffer：购自大连宝生物工程有限公司；RNA提取试剂盒、Rayscript cDNA Synthesis试剂盒：购自上海捷瑞生物技术有限公司；Axygen DNA Gel Extraction Kit：购自Axygen公司。

旋涡震荡器QL-861：购自江苏省海门市麒麟医用仪器厂；洁净工作台SW-CJ-2D：购自苏州净化设备有限公司；台式高速冷冻离心机Neofuge13R：购自上海力申科学仪器有限公司；普通PCR仪：购自北京东胜创新生物科技有限公司；金属恒温连接仪：购自Eppendorf公司；移液器：购自德国Eppendorf公司；NanoDrop 5000：购自美国Thermo；电泳仪Mini Pro 300 V：购自美国Power supply major science公司；电泳槽Labnet Sub System 70：购自美国Labnet公司；Rotor-Gene 3000 荧光定量PCR仪：购自德国QIAGEN公司。

1.3 引物设计与合成

参照GenBank登录的PDCoV基因序列，对不同毒株基因进行序列比对，筛选M基因保守区域，并以其为靶基因设计2对特异性引物，预期扩增目的片段长度分别为235和108 bp。上述引物由上海捷瑞生物技术有限公司合成，特异性引物序列见表1。

表1 引物序列

名称	序列	碱基数/位置	片段大小/bp
MF	CGCAGAAGAGTGGCAAATTATTGTT	25 9	235
MR	GGATATGAAGGTCAGTACGGCAAAA	25 243	
RE-F	5'-CGCGTAATCGTGTGATCTATG-3'	21 86	108
RE-R	5'-CCTTCTAGATGATCTGTCAACTG-3'	24 193	

1.4 模板制备及病毒核酸的提取和反转录

取500 mg阳性粪便样品加入500 μL灭菌生理盐水，以5 000 r/min的转速4 ℃离心30 min，弃沉

淀保留上清。取100 μL 上清, 加入200 μL RnaExTM试剂, 漩涡震荡器上振荡混匀破碎细胞5~20 s (2~3次), 加入500 μL RnaExTM试剂, 颠倒混匀, 室温裂解5 min。加入0.2 mL氯仿, 漩涡振荡, 室温静置2 min。12 000 r/min、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心10 min。取400 μL 上清加入到无菌无RNA酶的1.5 mL EP管中, 按2: 1的比例加入200 μL 无水乙醇, 充分混匀, 然后将上述溶液全部转移到套放于2 mL收集管内的吸附柱中。8 000 r/min 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心1 min, 除去收集管中的废液。加入500 μL Buffer RWA, 12 000 r/min 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心1 min, 除去收集管中的废液。重复用Buffer RWA洗1次。12 000 r/min 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心1 min, 除去收集管, 将柱子放入无菌无酶的1.5 mL离心管中, 晾干2 min, 在柱内膜的中央小心加入50 μL DEPC水溶解RNA, 室温2 min。12 000 r/min 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心1 min, 收集RNA置于-70 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

以上述方法提取的RNA为模板, 用Rayscript cDNA Synthesis KIT进行反转录, 合成cDNA, 于-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。反应体系30 μL : Random primer 1.0 μL 、随机引物 1.0 μL 、5 \times RT Buffer 6.0 μL 、dNTP 1.0 μL 、Rnase Inhibitor 1.0 μL 、M-MLV反转录酶1.0 μL 、RNA 12.0 μL , 用H₂O补至30 μL 。反应程序为: 37 $^{\circ}\text{C}$ 1 h, 85 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。

1.5 标准品鉴定和制备

以cDNA板进行PCR反应, 反应体系为25 μL , 具体如下: 2 \times Premix Ex Taq缓冲液12.5 μL , MF和MR各(10 pmol/mL) 1.0 μL , cDNA模板 2 μL , 最后用灭菌去离子水补至25 μL 。PCR反应条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 52 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 30个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。PCR产物用Axygen DNA Gel Extraction Kit回收, 将目的片段克隆到 pUC19载体, 并转化大肠杆菌DH5- α 中。摇菌筛选阳性克隆, 提取质粒, 并对重组阳性质粒PCR鉴定、测序, 筛选基因序列正确的质粒作为标准品。用紫外分光光度计检测质粒浓度, 根据公式换算质粒浓度到copies/ μL , -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.6 荧光定量PCR反应条件优化及标准曲线建立

通过对荧光定量PCR反应体系中的引物浓度

和反应条件等进行筛选和优化, 最终确定的反应体系为: RE-F和RE-R (10 pmol/mL) 各0.8 μL , 模板1.0 μL , SYBR Green I 反应液10.0 μL , 灭菌去离子水补充至总体积20 μL ; 最佳反应条件为95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 59 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 40个循环。用Easy dilution buffer将质粒pUC19-M进行10倍梯度稀释以制备标准品, 以不同浓度标准品为模板, 在Rotor Gene荧光定量PCR仪上进行检测, 获得扩增动力学曲线, 并依此绘制标准曲线。

1.7 实时荧光定量PCR评价

1.7.1 特异性试验 本试验以几种常见猪病疫苗毒为参照进行特异性试验。分别提取PEDV、TGEV、PoRV、PRRSV、CSFV的RNA, 以最佳反应体系和最佳反应条件, 在Rotor Gene荧光定量PCR仪上进行操作, 试验中同时设立阴性和阳性对照。

1.7.2 敏感性试验 梯度稀释已知浓度的重组质粒(2.49 \times 10⁸~2.49 \times 10⁰ copies/ μL), 吸取1.0 μL 不同浓度质粒作为模板, 进行Real-time PCR, 得出本研究所建立的检测方法所能检出的最低拷贝数。同时取上述相同体积质粒作为模板进行常规PCR, 以比较两种方法的敏感性。

1.7.3 重复性试验 选取3个已知浓度标准品(2.49 \times 10⁶、2.49 \times 10⁴、2.49 \times 10²)作为批间和批内重复试验的模板进行Real-time PCR, 对试验数据进行统计学分析。上述3个浓度标准品分别设立3个重复, 在同一反应条件下同时检测, 通过分析试验所得的C_t值进而计算批内变异系数; 将上述3个浓度标准品置-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存, 每次间隔1周连续检测3次, 通过分析试验所得的C_t值计算批间变异系数。

1.8 临床样品检测

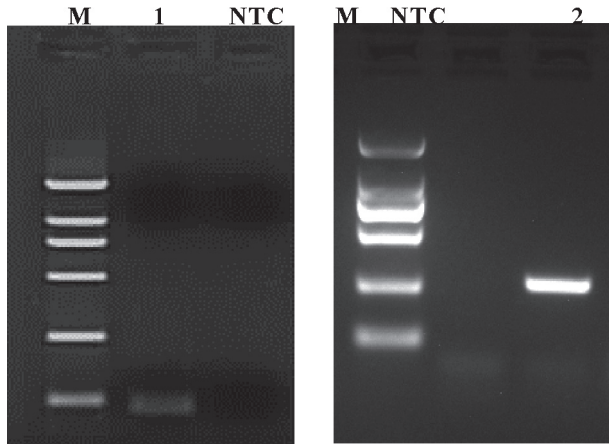
将2017年收集的62份粪便样品及1 168份进境种猪粪便拭子, 按照1.4所述方法提取RNA并反转录成cDNA, 以最佳反应体系和反应条件进行Real-time PCR检测, 同时以上述样品的cDNA作为模板进行常规PCR检测, 对比两种方法的检测结果。

2 结果

2.1 目的片段扩增

以设计的RE-F、RE-R特异性引物进行PCR扩增, 获得大小为108 bp的目的片段。测序结果显

示, 试验扩增的目的片段与亲本PDCoV基因序列的一致性为100% (图1)。以MF和MR扩增获得的M基因 (扩增长度为235 bp, 图1), 用于与载体pUC19连接构建重组质粒, 并作为标准品。



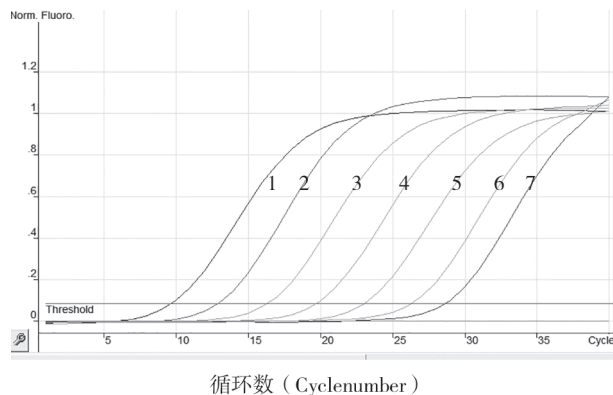
M. DL2000 DNA分子质量标准; 1. 108 bp目的片段; 2. 235 bp 目的片段; NTC. 阴性对照

图1 PDCoV引物特异性的PCR 鉴定

2.2 标准曲线建立

提取阳性重组质粒, 并用紫外分光光度计测得质粒DNA的浓度为527 ng/μL, 经过计算得出其拷贝数为 2.49×10^9 copies/μL, 对该质粒进行10倍梯度稀释, 选择 $2.49 \times 10^8 \sim 2.49 \times 10^2$ copies/μL的质粒作为标准品。

将质粒标准品按照最佳反应条件进行Real-time PCR反应, 发现质粒浓度在 $2.49 \times 10^8 \sim 2.49 \times 10^2$ copies/μL之间呈现良好的线性关系。扩增曲线 (图2) 分析表明, 曲线1、2、3、4、5、6、7分别为模板浓度是 2.49×10^8 、 2.49×10^7 、 2.49×10^6 、 2.49×10^5 、



1~7. 2.49×10^8 、 2.49×10^7 、 2.49×10^6 、 2.49×10^5 、 2.49×10^4 、 2.49×10^3 、 2.49×10^2 copies/μL; NTC. 阴性对照

图2 标准品的动力学曲线

2.49×10^4 、 2.49×10^3 、 2.49×10^2 copies/μL的质粒标准品动力学曲线; 质粒标准品从 $2.0 \times 10^8 \sim 2.0 \times 10^2$ copies/μL的Ct值分别为8.31、11.47、14.77、18.18、21.53、24.57、27.00。标准曲线分析表明, 斜率为-3.18, x轴截距为35.13, 直线方程为 $y = -3.18x + 35.13$, 相关系数 (R^2) 为0.998, 扩增效率为1.06 (图3)。

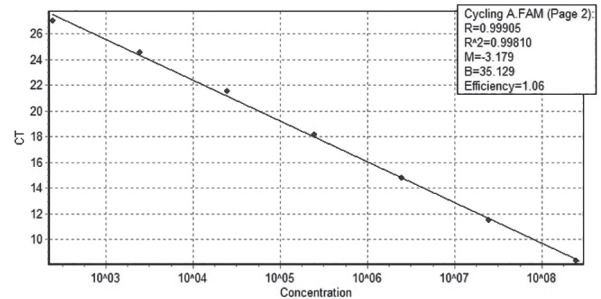
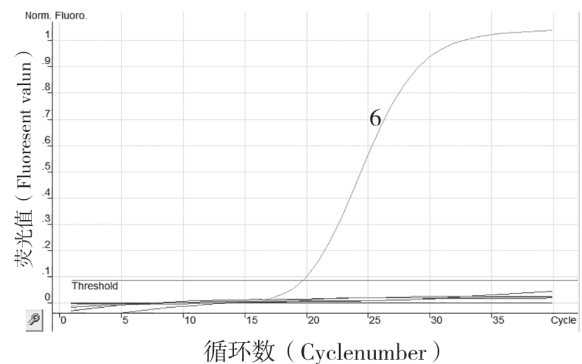


图3 标准曲线

2.3 特异性

采用Real-time PCR检测PEDV、TGEV、PoRV、PRRSV、CSFV不同病毒的RNA, 结果均为阴性, 其特异性扩增曲线见图4。



1~5. PEDV、TGEV、PoRV、CSFV和PRRSV的扩增曲线; 6. PDCoV阳性对照; 7. NTC;

图4 特异性试验结果

2.4 重复性

采用Real-time PCR, 对 2.49×10^6 、 2.49×10^4 、 2.49×10^2 copies/μL的标准品分别进行批内重复试验及批间重复试验, 发现批内变异系数分别为0.99%、0.67%、1.00%, 批间变异系数分别为2.85%、1.70%、2.04% (表2)。以上结果显示, 3个不同浓度标准品作为模板进行Real-time PCR反应所得Ct值的批间和批内变异系数均小于3%, 表明本

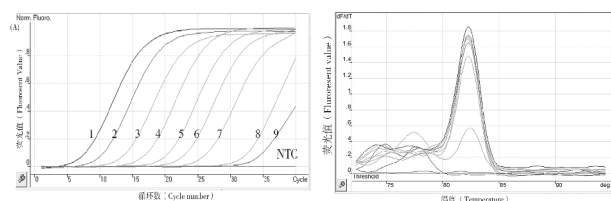
研究所建立的方法具有很好的稳定性。

表2 PDCoV荧光定量PCR重复性试验数据分析

标准品 / (copies/ μL)	批内重复				标准 变异 系数 /%	批间重复				标准 变异系 数 /%
	3次试验 Ct 值			标准		3次试验 Ct 值			标准	
	1	2	3			1	2	3		
2.49×10^6	14.55	14.28	14.34	0.14	0.99	14.55	14.82	14.01	0.41	2.85
2.49×10^4	20.83	21.03	21.10	0.14	0.67	20.83	21.55	21.22	0.36	1.70
2.49×10^2	27.75	27.29	27.26	0.27	1.00	27.75	26.88	26.72	0.55	2.04

2.5 敏感性

以 $2.49 \times 10^8 \sim 2.49 \times 10^0$ copies/μL的质粒标准品为模板,对每个浓度1.0 μL进行实时荧光定量PCR和常规PCR。结果显示,Real-time PCR对质粒标准品的检测下限为24.9 copies/μL,而常规PCR的检测下限为 2.49×10^3 copies/μL(图5、表3),表明Real-time PCR比常规PCR敏感约100倍。



(A) 扩增曲线; (B) 熔解曲线
1~9: 2.49×10^8 、 2.49×10^7 、 2.49×10^6 、 2.49×10^5 、 2.49×10^4 、 2.49×10^3 、 2.49×10^2 、 2.49×10^1 、 2.49×10^0 copies/μL; NTC. 阴性对照

图5 荧光PCR敏感性

表3 敏感性试验数据分析

标准品浓度 / copies/μL	荧光 PCR	常规 PCR
2.49×10^8	+	
2.49×10^7	+	+
2.49×10^6	+	+
2.49×10^5	+	+
2.49×10^4	+	+
2.49×10^3	+	+
2.49×10^2	+	-
2.49×10^1	+	-
2.49×10^0	-	-

2.6 样品检测

检测2017年收集的猪腹泻粪便样品62份,应用Real-time PCR、常规PCR对病料进行检测。结果显示,在62份待检样品中,Real-time PCR检出26份阳性,常规PCR检出16份阳性(表4)。检测结果表明,本试验建立的实时荧光定量PCR较常规PCR方法的检出率更高。用上述两种方法对2017年源自美国和加拿大的种猪粪便拭子进行检测,发现均为阴性,二者一致性达100%。

表4 样品PDCoV检测结果 单位:份

病料来源	样品数	阳性样品数	
		荧光定量 PCR	常规 PCR
天津	7	1	0
北京	5	2	0
上海	2	0	0
山西	4	1	1
辽宁	16	3	3
黑龙江	12	7	6
浙江	16	12	6
总数	62	26	16

3 讨论

近期,病毒分类国际委员会提议将冠状病毒分为4个属,即 α 、 β 、 γ 和 δ ^[19],在PDCoV发现之前, δ 冠状病毒成员为鸟类冠状病毒,以哺乳动物为宿主的冠状病毒几乎归属为 α 、 β 群。早在2012年,香港大学学者在进行冠状病毒流行病学调查时,就已经发现了该病毒,并将其归为 δ 冠状病毒^[20],只是当时并未引起重视。2014年美国暴发多起腹泻疫情,经鉴定为PDCoV引起,此时PDCoV才受到广泛关注^[5, 7-8, 11, 17, 21]。作为仔猪腹泻新病原,PDCoV的出现给全球仔猪病毒性腹泻防控带来了新挑战。因此,世界各国研究人员针对PDCoV开展了一系列研究,包括病毒基因序列分析、蛋白功能研究、病毒分离培养以及动物试验、检测方法建立(ELISA、RT-PCR、探针法荧光PCR)等^[9, 12-18]。本研究通过对GenBank上登录的PDCoV国内外毒株基因序列分析,选择最保守的M基因为靶基因设计特异性引物,建立了SYBR Green I荧光PCR方法,用于检测该病毒。本实验室检疫的活猪来源于美国和加拿大。而这两个国家都报道发生过PDCoV引起的腹泻疫情,这就更突显了口岸疫情监测的重要性与必要性。

4 结论

本研究将SYBR Green I荧光PCR技术应用于PDCoV检测。评价数据显示,建立的方法具有较好的特异性,呈现典型的扩增曲线,且熔解曲线为单一特异峰(T_m 值为82.7℃),敏感性可达24.9 copies/μL,批内、批间变异系数均小于3%,表现出较好的重复性。用本研究所建方法和常规PCR同时对62份猪腹泻粪便样品进行检测,发现前者检出率更高;两种方法对1 168份进境活猪粪便拭子的检测符合率为100%。因此,该方法实现了快速、

灵敏、特异的检测目的,操作简单且检测成本低,可用于猪场分子流行病学调查及早期诊断,也可用于组织病毒载量研究。该方法的建立为PDCoV致病机理的研究奠定了基础,同时为防止外来重要动物疫病传入提供了技术手段和保障,有助于我国生猪检验检疫体系的进一步完善。

参考文献:

- [1] 冯力, 时洪艳, 陈建飞. 猪病毒性腹泻疾病的预防[J]. 养猪, 2005 (5): 35-37.
- [2] 陈建飞, 刘孝珍, 时洪艳, 等. 2010—2011年仔猪腹泻的病因分析和防控措施[J]. 养猪, 2011 (5): 81-83.
- [3] 张志, 王幼明, 李晓成. 中国规模猪场腹泻调查[J]. 中国动物检疫, 2014, 31 (11): 1-4.
- [4] WANG L, BYRUM B, ZHANG Y. New variant of porcine epidemic diarrhea virus, United States, 2014[J]. Emerging infectious diseases, 2014, 20 (5): 917-919.
- [5] WANG L, BYRUM B, ZHANG Y. Detection and genetic characterization of deltacoronavirus in pigs, Ohio, USA, 2014[J]. Emerging infectious diseases, 2014, 20 (7): 1227.
- [6] 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.
- [7] MARTHALER D, JIANG Y, COLLINS J, et al. Complete genome sequence of strain SDCV/USA/Illinois121/2014, a porcine deltacoronavirus from the United States[J]. Genome announcements, 2014, 2 (2): e00218-14. DOI: 10.1128/genomeA.00218-14.
- [8] LI G, CHEN Q, HARMON K M, et al. Full-length genome sequence of porcine deltacoronavirus strain USA/IA/2014/8734[J]. Genome announcements, 2014, 2 (2): e00278-14. DOI: 10.1128/genomeA.00278-14.
- [9] MARTHALER D, RAYMOND L, JIANG Y, et al. Rapid detection, complete genome sequencing, and phylogenetic analysis of porcine deltacoronavirus[J]. Emerging infectious diseases, 2014, 20 (8): 1347.
- [10] LEE S, LEE C. Complete genome characterization of Korean porcine deltacoronavirus strain KOR/KNU14-04/2014[J]. Genome announcements, 2014, 2 (6): e01191-14. DOI: 10.1128/genomeA.01191-14.
- [11] MA Y, ZHANG Y, LIANG X, et al. Origin, evolution, and virulence of porcine deltacoronaviruses in the United States[J]. Mbio, 2014, 6 (2): e00064.
- [12] MINGJUN S U, CHUNQIU L I, GUO D, et al. A recombinant nucleocapsid protein-based indirect enzyme-linked immunosorbent assay to detect antibodies against porcine deltacoronavirus[J]. Journal of veterinary medical science, 2016, 78 (4): 601-606.
- [13] LEE J H, CHUNG H C, NGUYEN V G, et al. Detection and phylogenetic analysis of porcine deltacoronavirus in Korean swine farms, 2015[J]. Transboundary & emerging diseases, 2016, 63 (3): 248-252.
- [14] THACHIL A, GERBER P F, XIAO C T, et al. Development and application of an ELISA for the detection of porcine deltacoronavirus IgG antibodies[J]. Plos one, 2015, 10 (4): e0124363.
- [15] OKDA F, LAWSON S, LIU X, et al. Development of monoclonal antibodies and serological assays including indirect ELISA and fluorescent microsphere immunoassays for diagnosis of porcine deltacoronavirus[J]. BMC veterinary research, 2016, 12 (1): 95.
- [16] ZHANG J, TSAI Y L, LEE P A, et al. Evaluation of two singleplex reverse transcription-insulated isothermal PCR tests and a duplex real-time RT-PDR test for the detection of porcine epidemic diarrhea virus and porcine deltacoronavirus[J]. Journal of virological methods, 2016, 234: 34-42.
- [17] SINHA A, GAUGER P, ZHANG J, et al. PCR-based retrospective evaluation of diagnostic samples for emergence of porcine deltacoronavirus in US swine[J]. Veterinary microbiology, 2015, 179 (3/4): 296-298.
- [18] MCCLUSKEY B J, HALEY C, ROVIRA A, et al. Retrospective testing and case series study of porcine delta coronavirus in U.S. swine herds[J]. Preventive veterinary medicine, 2016, 123: 185-191.
- [19] DE GROOT R J, BAKER S C, BARIC R, et al. Coronaviridae[M]. King A M Q, Adams M J, Carstens E B, et al, editors. London: Elsevier Academic Press, 2011: 806-828.
- [20] WOO P C Y, LAU S K P, LAM C S F, et al. Discovery of seven novel mammalian and avian coronaviruses in the genus deltacoronavirus supports bat coronaviruses as the gene source of alphacoronavirus and betacoronavirus and avian coronaviruses as the gene source of gammacoronavirus and deltacoronavirus[J]. Journal of virology, 2012, 86 (7): 3995-4008.
- [21] HU H, JUNG K, VLASOVA A N, et al. Isolation and characterization of porcine deltacoronavirus from pigs with diarrhea in the United States[J]. Journal of clinical microbiology, 2015, 53 (5): 1537-1548.

(责任编辑: 朱迪国)