

猪流行性腹泻病毒、猪肠道病毒 9 型及猪嗜病毒三重 RT-PCR 检测方法建立及初步应用

任玉鹏, 张 斌*, 岳 华, 刘 燕

(西南民族大学 生命科学与技术学院, 成都 610041)

摘 要: 旨在建立一种同时检测猪流行性腹泻病毒(PEDV)、猪肠道病毒 9 型(PEV-9)、猪嗜病毒(PKV)的三重 RT-PCR 法, 并初步应用于临床样品检测。根据 GenBank 中 PEDV 和 PKV 基因序列保守区设计 2 对引物, 参照文献合成 1 对 PEV-9 引物, 在同一体系进行 RT-PCR 扩增, 对引物浓度、退火温度、灵敏度、特异性等进行优化, 应用该法对采自四川省 6 个猪场 46 份样品进行检测。结果表明引物量分别为 PEDV 0.5 μ L、PEV-9 0.25 μ L、PKV 0.25 μ L, 退火温度为 55 $^{\circ}$ C 时扩增效果最理想; 本方法最低检测量分别为 PEDV 5.97 pg、PEV-9 0.11 pg、PKV 0.74 pg; 用该方法对猪瘟病毒、猪繁殖与呼吸综合征病毒、猪圆环病毒、猪萨佩罗病毒、猪博卡病毒、猪环曲病毒、猪源大肠杆菌、猪源沙门菌、副猪嗜血杆菌、猪链球菌和空肠弯曲杆菌等病原进行 RT-PCR 扩增时, 均无非特异性扩增条带出现。对 46 份腹泻样品的检测结果显示, PEDV 感染率为 76.1%、PEV-9 为 73.9%、PKV 为 39.1%, 3 种病原在同一样本检出率达 29.1%, 表明存在混合感染或协同致病的可能; 与单项 RT-PCR 法相比, 阳性样本的检出符合率均在 91% 以上, 表明该方法具较高可信度。建立的方法可快速、准确地检测 3 种猪腹泻病毒性病原, 为病原学诊断和分子流行病学调查提供了有效技术支持。

关键词: 多重 RT-PCR; PEDV; PEV-9; PKV; 检测

中图分类号: S858.285.3; S852.659.6

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2014)04-0603-06

Development and Application of a Triplex RT-PCR for Detecting Porcine Epidemic Diarrhea Virus, Porcine Enterovirus-9 and Porcine Kobuvirus

REN Yu-peng, ZHANG Bin*, YUE Hua, LIU Yan

(College of Life Science and Technology, Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041, China)

Abstract: The aim of this study was to establish a triplex for simultaneously detecting porcine epidemic diarrhea virus (PEDV), porcine enterovirus-9 (PEV-9), and porcine kobuvirus (PKV). Two pairs of special primers were designed according to the published sequences of PEDV, PKV in GenBank, one primers of PEV-9 were synthesized according to reference. A mixture of 3 pairs of primers was used for amplification of viral nucleic acids, yielding 3 different amplicons with sizes of 681 bp, 454 bp, and 313 bp for PEDV, PKV and PEV-9 respectively by optimizing the reaction condition. Testing of the sensitivity of multiplex RT-PCR indicated that the lowest detection limits were 5.97 pg for PEDV, 0.11 pg for PEV-9, 0.74 pg for PKV, respectively. For the specificity test, all of pathogens in the negative controls were found no amplicons. A total of 46 specimens from piglets with acute diarrheas collected from Sichuan province were tested by triplex RT-PCR, and the positive rate were as follows: PEDV 76.1%, PKV 39.1%, PEV-9 73.9%, and the

收稿日期: 2013-09-24

基金项目: “十二五”国家高技术研究发展(863)计划项目(2012AA101304); 西南民族大学中央高校基本科研业务费专项资金项目(2014NZYQN42); 四川省教育厅创新团队项目(13TD0057); 西南民族大学研究生学位点建设项目(2014XWD-S0906)

作者简介: 任玉鹏(1986-), 男, 四川雅安人, 助理实验师, 硕士, 主要从事动物传染病病原分子生物学研究, E-mail: renyupeng1986@163.com

* 通信作者: 张 斌, 副研究员, E-mail: binovy@sina.com

positive accordance rate between simplex and triplex PCR of PEDV, PEV-9, PKV were 100%, 91%, and 94% respectively. In addition, the fact that three pathogens were detected simultaneously in one sample indicated mixed infection in the diarrhea disease. It was also suggested that the pathogenic mechanisms of three kinds of pathogens is somehow synergetic. This study showed that the triplex RT-PCR may be a useful tool for rapid and sensitive etiological diagnosis for acute viral diarrheas in piglets and provides an effective technical support for pathogenic molecular epidemiology investigation. Besides, it established the foundation that we can further explore the relationship between the traditional diarrhea pathogens and potential new intestinal pathogens.

Key words: triplex RT-PCR; PEDV; PEV-9; PKV; detection

猪腹泻病是影响中国养猪业发展的重要原因之一,近年由腹泻导致猪死亡数逐年上升,据 2010—2011 年统计显示中国南部 10 省腹泻死亡猪数量超过 100 万头,造成严重经济损失^[1]。目前研究表明在引起猪腹泻的病毒性病因中以冠状病毒科猪流行性腹泻病毒 (porcine epidemic diarrhea virus, PEDV) 为主, PEDV 广泛流行于诸如中国、韩国、泰国、越南等东南亚地区^[2-3],且在分子流行病学调查中发现各国流行株遗传进化关系较近,这表明 PEDV 或在生猪贸易过程中被传播^[4],因此有必要建立高效、灵敏的检测手段应用于检疫工作。此外,诸多罕见病原也不断从腹泻粪便中检出,其中包括小 RNA 病毒科猪肠道病毒 (porcine enterovirus, PEV)、猪嗜病毒 (porcine kobuvirus, PKV) 等^[5]。PEV 是肠道病毒属成员之一,目前已被证实的血清型共 13 个,主要经消化道传播,无明显临床表现,其中 PEV-9 型可能导致猪产生脑脊髓灰质炎以及消化道、呼吸道症状,由此推断 PEV-9 具有条件致病可能^[6]。PKV 为嗜病毒属成员,是单股正链 RNA 病毒,主要引起猪、牛和人的病毒性腹泻,该病毒自 2007 年在匈牙利首次被发现后世界各地就陆续有检出报道^[7];张莎等对来自中国 24 省 236 份病料进行 PKV 检测发现阳性率为 42.85%,病毒分布几乎覆盖整个中国大陆^[8]。虽然对于此类病毒是否与肠道疾病腹泻相关尚无确切定论,但有证据表明其在腹泻病例的检出率较高,推断其对猪胃肠炎有协同致病作用,故而有进一步研究的必要^[9]。为了及时准确地对四川地区猪腹泻病因进行调查和监测,并为进一步探索传统腹泻病原和肠道潜在新病原的相互关系奠定基础,本研究拟首次建立针对 PEDV、PEV-9、PKV 三病原的多重 RT-PCR 检测法,优化反应体系及条件,同时验证其特异性和灵敏度,并初步将该法应用于 46 份腹泻样本的检测。

1 材料与方法

1.1 毒株、菌株和试剂

猪瘟脾淋苗购自天津瑞普生物技术股份有限公司;猪繁殖与呼吸综合征病毒 R98 株 (蓝克清) 购自四川民生药业有限责任公司;猪嗜病毒、猪肠道病毒 9 型、猪圆环病毒、猪萨佩罗病毒、猪博卡病毒、猪环曲病毒阳性核酸样品由上海交通大学兰道亮博士馈赠;猪流行性腹泻病毒、猪源大肠杆菌 N0311 株、猪源沙门菌 T0412 株、副猪嗜血杆菌 Nasagaki 株、猪 2 型链球菌 2011W70 株、猪源空肠弯曲杆菌 N0720 株由西南民族大学动物医学教研室传代保存; *E. coli* DH5 α 由西南民族大学动物医学教研室传代保存。

2 \times Taq PCR Master Mix、DL2000 购自北京天根生化科技有限公司; pMD19-T Simple 载体试剂盒、Prime ScriptTM RT-PCR Kit (RNA 反转录试剂盒) 购自宝生物工程 (大连) 有限公司; *E. Z. N. A*TM Gel Extraction Kit (D2501-01) 和 *E. Z. N. A*TM Plasmid MiniKit (D6942-01) 购自美国 Omega 生物技术公司。

1.2 引物

以 GenBank 收录的 PEDV CV777 株 (登录号: AF353511)、PKV S-1-HUN 株 (登录号: EU787450) 基因序列为参考,用 Blast 同其他毒株序列比对分析,用 Oligo 6.0 对基因保守区域设计 2 对引物,同时参考文献^[10]合成 1 对 PEV-9 检测引物,为使各引物在相同条件下扩增具相容性,将引物 T_m 值参数范围设定在 53~55 $^{\circ}\text{C}$,序列见表 1。引物均由上海生工生物工程有限公司合成。

1.3 样品处理

将本实验室保存的 PEDV 接种 Vero 细胞,待 48 h 出现规律 CPE,将培养物反复冻融 3 次,10 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,收集上清,置 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冻存备用;

表 1 PEDV、PEV、PKV 扩增引物

Table 1 The primer sequences for multiplex PCR

引物 Primer	序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')	G+C 含量/% Content of G+C	长度/bp Length (bp)
PEDV	ATGTCTAACGGTTCTATTCC	45.5	681
	TTAGACTAAATGAAGCACTT	45.8	
PEV-9	CAAGCACTTCTGTCTCCCCGG	61.9	313
	GTTAGGATTAGCCGCATTCA	45.0	
PKV	TCGGGACTGGTTTGGAGG	55.6	454
	CAGCCGCGACTCTATCAA	66.1	

从四川省雅安、眉山、温江、崇州、大邑、邛崃等地部分规模化养殖场,无菌采集腹泻猪小肠内容物,置 -80°C 备用。用 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PBS 缓冲液稀释样品并充分混匀,静置 10 min,反复冻融 3 次,以 $10\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清液待检。

1.4 cDNA 模板制备

按 RNAiso plus (Total RNA 提取试剂)说明书,在病毒细胞培养物或待检样品中依次加入 RNAiso plus、氯仿等,振荡混匀后离心,以无 RNA 酶乙醇沉淀核酸,离心弃上清,待样品干燥后,加入 $30\sim 50\ \mu\text{L}$ 无 RNA 酶去离子水溶解沉淀,置 -20°C 保存。

用 Prime ScriptTM RT-PCR 试剂盒进行反转录,体系含总 RNA $7\ \mu\text{L}$, $5\times$ Buffer $2\ \mu\text{L}$, oligo (dT) $0.5\ \mu\text{L}$, Prime Script RTase $0.5\ \mu\text{L}$, 反应程序: 37°C 20 min, 85°C 5 s, 4°C 1 min。反转录产物置 -20°C 备用。

1.5 单项 PCR 扩增及优化

以 PEDV、PEV-9、PKV cDNA 为模板,用 3 对引物分别建立单项 PCR 检测法,反应体系均为:模板 $1.0\ \mu\text{L}$, $2\times$ PCR Master Mix $12.5\ \mu\text{L}$, 上下游引物各 $0.5\ \mu\text{L}$, ddH₂O $10.5\ \mu\text{L}$, 总体积 $25\ \mu\text{L}$ 。PCR 扩增条件: 94°C 5 min; 94°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 40 s, 30 个循环; 72°C 延伸 8 min; 同时设置不同的退火温度及引物浓度进行扩增,优化反应条件。

取上述扩增产物各 $3\ \mu\text{L}$, 在含溴乙锭的琼脂糖凝胶板上点样,加入 DNA 相对质量标准作对照,以 130 V 电压电泳 40 min, 在凝胶成像仪中观察结果并拍照。

参照《分子克隆》(第 3 版)^[11]将基因片段克隆至 pMD19-T 载体,分别命名为 pMD-PEDV、pMD-

PEV、pMD-PKV, 并送样到上海英骏生物技术有限公司进行测序,用 Blast 比对分析结果。

1.6 多重 PCR 扩增及优化

同时将 PKV、PEV-9、PEDV 的 3 对特异性引物在同一体系中进行 PCR 扩增。保持酶浓度和缓冲体系不变,以 3 种引物不同添加量确定各自最适浓度。扩增条件: 95°C 5 min; 95°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 40 s, 30 次循环; 72°C 延伸 8 min。

在优化过程中以最佳引物浓度体系进行扩增,分别设 53.1 、 55 、 56.7 、 58.1 、 59.0°C 5 个退火温度进行优化反应。

1.7 特异性检测

按试验 1.4 中方法制备猪瘟脾淋苗、PRRSV R98 株弱毒株 cDNA 模板;参考文献[8]CTAB 法抽提大肠杆菌 N0311 株、猪 2 型链球菌 2011W70 株、猪源沙门菌 T0412 株、副猪嗜血杆菌 Nasagaki 株、空肠弯曲杆菌 N0720 株 DNA 置 -20°C 备用;以 PKV、PEV-9、PEDV 阳性核酸样品作阳性对照,无模板反应体系作阴性对照,参照试验 1.6 中优化的三重 PCR 反应体系及条件,对上述制备模板和猪圆环病毒、猪萨佩罗病毒、猪博卡病毒、猪环曲病毒阳性核酸样品做特异性检验。

1.8 敏感性试验

用美国 OMEGA 公司质粒抽提试剂盒抽提重组质粒,在核酸蛋白分析仪中测定各质粒浓度,并将其等体积混合后进行 5 倍倍比稀释,各取 $1\ \mu\text{L}$ 作模板进行 PCR 扩增。

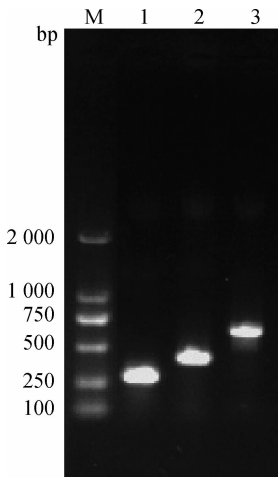
1.9 多重 PCR 检测法的比较与初步应用

以本试验建立的单项 RT-PCR 检测法与三重 RT-PCR 检测法同时对 46 份临床粪便样本,分析不同检测法的结果符合率。

2 结果

2.1 单重 PCR 检测法的建立

以 PEDV、PEV-9、PKV cDNA 为模板,将 3 对引物按不同浓度及退火温度进行 PCR 扩增;结果显示, PEDV 引物的最佳反应体系及条件为引物量 $0.5 \mu\text{L}$,退火温度 51.3°C ; PEV-9 在引物量为 $0.2 \mu\text{L}$,退火温度 55°C 时反应效果最佳; PKV 在 $0.25 \mu\text{L}$,退火温度 55°C 时效果最佳(图 1)。将扩增产物回收并克隆后的重组质粒 pMD-PEDV、pMD-PEV、pMD-PKV 送样到上海英骏生物技术有限公司测序后,进行 Blast 比对,结果表明目的基因与参考序列相似性均达 96% 以上。



M. DL2000 相对分子质量标准; 1. PEV-9 PCR 产物; 2. PKV PCR 产物; 3. PEDV PCR 产物

M. DL2000 DNA marker; 1. The amplification products of PEV-9; 2. The amplification products of PKV; 3. The amplification products of PEDV

图 1 单项 PCR 扩增产物电泳

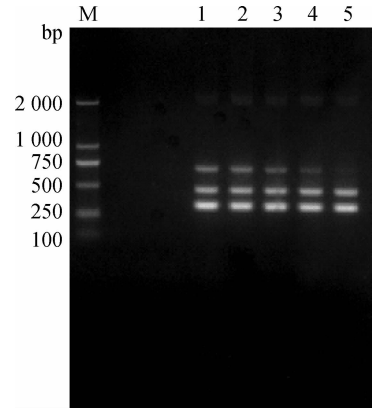
Fig. 1 PCR products of three pairs of primers

2.2 三重 PCR 条件优化

固定退火温度在 55°C ,于同一反应体系优化 3 对引物浓度,结果表明 PEDV $0.5 \mu\text{L}$ 、PEV-9 $0.25 \mu\text{L}$ 、PKV $0.25 \mu\text{L}$ 时扩增效果最理想;同时固定引物浓度,设 53.1 、 55 、 56.7 、 58.1 、 59.0°C 5 个退火温度进行优化,结果表明退火温度为 55°C 时 PCR 扩增效果最佳(图 2)。

2.3 三重 PCR 特异性检测

用已优化的 PCR 反应体系及条件对猪瘟病毒、猪繁殖与呼吸综合征病毒、猪圆环病毒、猪萨佩罗病毒、猪博卡病毒、猪环曲病毒、猪源大肠杆菌、猪源沙门菌、副猪嗜血杆菌、猪 2 型链球菌、空肠弯曲杆菌



M. DL2000 相对分子质量标准; 1~5. 退火温度 53.1 、 55 、 56.7 、 58.1 、 59.0°C 时 PCR 反应结果

M. DL2000 DNA marker; 1-5. PCR amplification at 53.1 、 55 、 56.7 、 58.1 、 59.0°C respectively

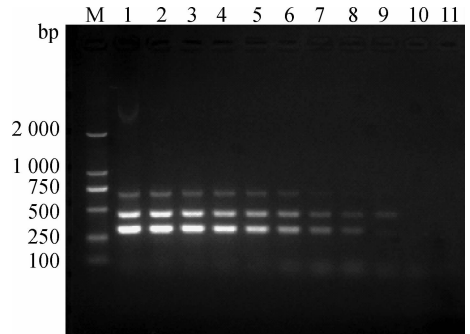
图 2 多重 PCR 退火温度优化

Fig. 2 Optimization of annealing temperature of multiple PCR

的 cDNA 或 DNA 模板进行扩增,以 PEDV、PEV-9、PKV 核酸样本作为阳性对照。结果表明除阳性对照外,其余泳道均无扩增条带出现(图略)。

2.4 三重 PCR 敏感性检验

敏感性试验结果表明,将 5 倍倍比稀释的混合质粒样品按试验 1.6 中优化条件进行 PCR 扩增时,最低能检测到 3 种质粒模板量分别为 PEDV 5.97 pg 、PEV-9 0.11 pg 、PKV 0.74 pg (图 3)。



M. DL2000 相对分子质量标准; 1. 原质粒模板; 2~11. 分别为质粒模板 $5^1 \sim 5^{10}$ 倍稀释后 PCR 结果

M. DL2000 DNA marker; 1. Plasmids template; 2-11. Plasmids template diluted for 5^1 、 5^2 、 5^3 、 5^4 、 5^5 、 5^6 、 5^7 、 5^8 、 5^9 and 5^{10} -fold respectively

图 3 多重 PCR 敏感性检测结果

Fig. 3 Sensitivity results of the multiple PCR detection

2.5 多重 PCR 检测法的比较与初步应用

用单项 RT-PCR 法和三重 RT-PCR 法同时对临床采集的 6 个猪场 46 份猪腹泻样品进行检测,结果显示,3 种病原的阳性率分别为 PEDV 76.1%、

PKV 39.1%、PEV-9 73.9%;其中未检出 PEDV 的腹泻样品中均有 PKV 和 PEV-9 检出,提示 PKV 和 PEV 可能与猪腹泻相关;2 种方法对 46 份粪便样品

检出符合率分别为 PEDV 100%、PEV-9 91%、PKV 94%,表明所建立的三重 RT-PCR 法具较高可信度(表 2)。

表 2 临床样本检测结果

Table 2 The detection of clinical samples

样品来源 Sample source	总数/份 Sample counts	PEDV		PEV-9		PKV	
		A	B	A	C	A	D
雅安市 Ya'an City	9	9	9	8	7	5	5
眉山县 Meishan District	7	7	7	7	7	1	1
崇州县 Chongzhou District	3	2	2	0	0	2	1
温江区 Wenjiang County	9	2	2	8	6	4	4
大邑县 Dayi District	6	4	4	5	5	2	2
邛崃区 Qionglai County	12	11	11	6	6	4	4

A. 三重 RT-PCR 法检出阳性样本;B. PEDV 单项 RT-PCR 法检出阳性样本数;C. PEV-9 单项 RT-PCR 法检出阳性样本数;D. PKV 单项 RT-PCR 检出阳性样本数

A. The numbers of positive samples detected by triplex RT-PCR;B. The numbers of positive samples detected by RT-PCR of PEDV;C. The numbers of positive samples detected by RT-PCR of PEV-9;D. The numbers of positive samples detected by RT-PCR of PKV

3 讨论

导致猪腹泻的病原繁多,流行病学调查资料显示 PEDV 是近年病毒性腹泻的主要因素之一^[1],该病毒主要经粪口途径传播,在胃和小肠黏膜上皮细胞内增殖^[12];PEDV 复制周期起始于被 S 蛋白活化的融合肽与细胞内成分融合介导的病毒侵入过程,释放具感染性的基因组 RNA 进入细胞质,其后病毒 ORF1ab 翻译成多聚前体蛋白,在 PLP 和 Mpro 蛋白酶作用下参与病毒基因组复制。研究发现被 PEDV 感染细胞表现出 I 型干扰素产生水平较低现象,推测其可能是通过抑制 IRF3 活化从而负调节 IFN- β 表达通路^[13]。在与 PEDV 同科属的 SARS 病毒研究中还发现如 PL_{pro} 等蛋白对 IFN 的拮抗作用^[14]。此外,PEDV PLP 蛋白酶也具有去泛素酶(DUB)活性和宿主干扰素拮抗活性。故 PEDV 存在多种逃避和拮抗宿主抗病毒天然免疫反应的复杂机制。

PEV 也是肠道常见病毒,在健康和患病猪中均有检出报道。研究发现在病猪肠道中有 PEV 复制,特别是结肠和回肠病毒滴度较高,但常以亚临床表现为主^[10];PKV 是近年新发现的一类与腹泻相关

的肠道病毒,在世界各地检出 PKV 阳性率 16.7% 到 99.0% 不等^[15-16]。本试验利用建立的三重 RT-PCR 法对 46 份腹泻样品进行检测,结果表明,在 PEDV 阳性样本中,PKV 和 PEV-9 检出率分别为 32.7% 和 89.5%,其中同一病料 3 种病原同时存在的样品阳性率达 29.1%;由此推断病原间存在协同致病的可能,这与 PEDV 感染引起的宿主细胞免疫抑制可能存在联系,例如在病毒对 IFN- β 表达通路的负调节和 PLP 去泛素化作用下拮抗细胞干扰素产生,从而抑制宿主细胞抗病毒免疫,而免疫抑制作用可能促进猪只隐性携带 PEV-9、PKV 增殖水平上升,从而加剧感染和胃肠道损坏。因此,有必要进一步对腹泻相关肠道病毒间协同致病机理进行深入探讨。

本研究以 PEDV CV777 株、PKV S-1-HUN 株基因序列为参考,经序列同源性、特异性分析,对基因保守区域分别设计特异性引物,同时参考文献合成一对 PEV-9 特异性引物,将 3 对引物在同一体系进行多重 PCR 扩增;经优化在引物量分别为 PEDV 0.5 μ L、PEV-9 0.25 μ L、PKV 0.25 μ L,退火温度 55 $^{\circ}$ C 时 PCR 扩增效果最佳;在特异性试验中对常见猪病原和诸如猪萨佩罗病毒、猪博卡病毒、猪环曲病毒等新报道的猪肠道病原进行 RT-PCR 检测,均

无扩增条带出现,表明初步建立的多重 RT-PCR 法特异性良好;敏感性试验结果显示该法可同时检测质粒模板量分别为 PEDV 5.97 pg、PEV-9 0.11 pg、PKV 0.74 pg,表明该法具较高灵敏度。将该三重 RT-PCR 法应用于临床粪便样品的检测,与已报道的单项 RT-PCR 法进行比较,结果表明粪便中 PEDV 阳性率为三者中最高,各方法检出结果符合率均高于 91%,提示该法应用于临床样本检测具可行性,为进一步深入探讨传统腹泻病原和肠道潜在新病原相互关系奠定了基础。

4 结 论

本试验首次建立了 PEDV、PEV-9、PKV 三重 RT-PCR 检测法,对其他多种猪常见病原均不检出;应用于 46 份临床样本检测,与单项 RT-PCR 法相比,阳性样本符合率均达 90%以上,具较高可信度。该检测法可应用于新的猪腹泻病原分子流行病学调查和疾病的诊断。

参考文献:

- [1] SUN R Q, CAI R J, CHEN Y Q, et al. Outbreak of porcine epidemic diarrhea in suckling piglets, China [J]. *Emerg Infect Dis*, 2012, 18(1): 161-163.
- [2] PARK S J, KIM H K, SONG D S, et al. Molecular characterization and phylogenetic analysis of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) field isolates in Korea [J]. *Arch Virol*, 2011, 156(4): 577-585.
- [3] DU Y D, TOAN N T, PURANAVEJA S, et al. Genetic characterization of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) isolates from southern Vietnam during 2009-2010 outbreaks [J]. *Thai J Vet Med*, 2011, 41(1): 55-64.
- [4] JEONG Y J, PARK S I, HOSMILLO M, et al. Detection and molecular characterization of porcine group C rotaviruses in South Korea [J]. *Vet Microbiol*, 2009, 138(3-4): 217-224.
- [5] 殷 震,刘景华. 动物病毒学[M]. 2 版,北京:科学出版社,1997.
- [6] KAKU Y, SARAI A, MURAKAMI Y. Genetic reclassification of porcine enteroviruses [J]. *J Gen Virol*, 2001, 82(2): 417-424.
- [7] REUTER G, BOLDIZSÁR A, KISS I, et al. Candidate new species of kobuvirus in porcine hosts [J]. *Emerg Infect Dis*, 2008, 14(12): 1968-1970.
- [8] 张 莎,石 达,陈建飞,等. 2012 年猪嗜病毒流行病学调查及 3D 基因的遗传变异分析[J]. 中国预防兽医学报, 2013, 35(2): 95-98.
- [9] REUTER G, KECSKÉMETI S, PANKOVICS P. Evolution of porcine kobuvirus infection, Hungary [J]. *Emerg Infect Dis*, 2010, 16(4): 696-698.
- [10] YANG S X, WANG Y, SHEN Q, et al. Prevalence of porcine enterovirus 9 in pigs in Middle and Eastern China [J]. *Virology*, 2013, 10: 99-105.
- [11] SAMBROOK J, RUSSELL D W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual [M]. 3rd ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [12] DEBOUCK P, PENSART M, COUSSEMENT W. The pathogenesis of an enteric infection in pigs, experimentally induced by the coronavirus-like agent CV777 [J]. *Vet Microbiol*, 1981, 6(2): 157-165.
- [13] 李宝贤,马广鹏,葛俊伟,等. 猪流行性腹泻病毒功能性受体的鉴定 [J]. 病毒学报, 2009, 25(3): 220-225.
- [14] 杨宇东,孙 莉,陈忠斌. SARS 冠状病毒 PLpro 蛋白酶的结构与功能 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2010, 26(1): 15-21.
- [15] KHAMRIN P, MANEEKARN N, KONGKAEW A, et al. Porcine kobuvirus in piglets, Thailand [J]. *Emerg Infect Dis*, 2009, 15(12): 2075-2076.
- [16] PARK S J, KIM H K, MOON H J, et al. Molecular detection of porcine kobuviruses in pigs in Korea and their association with diarrhea [J]. *Arch Virol*, 2010, 155(11): 1803-1811.

(编辑 白永平)