

余姓鸿,张婧,安徽,等.猪肉及制品中 HEV、PEDV 和 PDCoV 三重 qPCR 方法的建立与应用[J].食品工业科技,2024,45(2):210-219. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023020164

YU Xinghong, ZHANG Jing, AN Wei, et al. Establishment and Application of Triple-qPCR for HEV, PEDV and PDCoV in Pork and Its Products[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(2): 210-219. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023020164

· 分析检测 ·

# 猪肉及制品中 HEV、PEDV 和 PDCoV 三重 qPCR 方法的建立与应用

余姓鸿<sup>1</sup>,张婧<sup>1</sup>,安微<sup>1</sup>,杨苗<sup>1</sup>,谢礼<sup>1</sup>,舒佳新<sup>2</sup>,薛昌华<sup>1</sup>,郑巧<sup>1</sup>,林华<sup>1,\*</sup>,韩国全<sup>2,\*</sup>  
(1.成都海关技术中心,四川成都 610041;  
2.四川农业大学食品学院,四川雅安 625014)

**摘要:**人兽共患病引发的动物源性食品安全事件频发,为从食品原料源头上控制和保障其食用安全,控制猪肉及其制品消费成本,本研究构建了可同时检测猪肉及制品中戊型肝炎病毒(Hepatitis E virus, HEV)、猪流行性腹泻病毒(Porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)和猪 $\delta$ 冠状病毒(Porcine delta corona virus, PDCoV)三重实时荧光定量 PCR (Real-time Quantitative PCR, qPCR) 方法。结果表明,三重 qPCR 方法只能扩增出 3 种病毒的特异性基因片段,特异性好;对 HEV、PEDV 和 PDCoV 三种病毒的最低检测限分别为 6.02、6.98、6.92 copies/ $\mu$ L;组内和组间变异系数(CV%)在 0.10%~3.00%之间,重复性好。将所建立方法应用于 248 份出口猪肉及制品和 282 份生猪粪拭子的检测,同时以相应病毒标准检测方法进行平行检测,结果显示猪肉及制品中三种病毒的检出率均为 0%,与标准方法检测结果一致。生猪粪拭子中,该方法对 PEDV、PDCoV 和 HEV 三种病毒的检出率分别为 1.06%、3.19%、0.35%,标准方法检出率分别为 1.06%、3.19%、0%。研究表明,建立的三重 qPCR 检测方法能准确快速地检测猪肉及制品或生猪样品中三种病毒,为保障生鲜猪肉及其制品市场流通和阻断病毒食源性传播提供技术支持。

**关键词:**猪肉,戊型肝炎病毒(HEV),猪流行性腹泻病毒(PEDV),猪 $\delta$ 冠状病毒(PDCoV),三重 qPCR

中图分类号:TS201.3

文献标识码:A

文章编号:1002-0306(2024)02-0210-10

本文网刊:

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023020164



## Establishment and Application of Triple-qPCR for HEV, PEDV and PDCoV in Pork and Its Products

YU Xinghong<sup>1</sup>, ZHANG Jing<sup>1</sup>, AN Wei<sup>1</sup>, YANG Miao<sup>1</sup>, XIE Li<sup>1</sup>, SHU Jiaxin<sup>2</sup>, XUE Changhua<sup>1</sup>,  
ZHENG Qiao<sup>1</sup>, LIN Hua<sup>1,\*</sup>, HAN Guoquan<sup>2,\*</sup>

(1.Chengdu Customs Technology Center, Chengdu 610041, China;

2.Sichuan Agricultural University Food College, Ya'an 625014, China)

**Abstract:** Animal-derived food safety incidents caused by zoonotic diseases occur frequently. In order to control and ensure the safety of pork consumption from its raw material source and to control the cost of pork and its products consumption, this study constructed a triple real-time fluorescent quantitative PCR (qPCR) method that can simultaneously detect hepatitis E virus (HEV), porcine epidemic diarrhea virus (PEDV), and porcine  $\delta$  corona virus (PDCoV) in pork and its products. The results showed that the triple qPCR method could only amplify the specific gene fragments of three target viruses, which had high specificity. The minimum detection limits of the three viruses (HEV, PEDV, and PDCoV) were

收稿日期: 2023-02-16

基金项目: 四川省重点研发项目(2020YFS0469);海关总署科研项目(2019HK045)。

作者简介: 余姓鸿(1995-),女,硕士,助理工程师,研究方向:动物传染病病原分子生物学,E-mail: yuxh2657@163.com。

\*通信作者: 林华(1982-),男,博士,正高级兽医师,研究方向:动物传染病病原分子生物学,E-mail: cdclh@126.com。

韩国全(1979-),男,博士研究生,副教授,研究方向:微生物与食品安全,E-mail: hans\_980306@sicau.edu.cn。

6.02, 6.98 and 6.92 copies/ $\mu$ L respectively. The coefficient of variation (CV%) within and between groups ranged from 0.10% to 3.0%, with good repeatability. The established method was applied to detect 248 samples of pork products and exports and 282 raw pig manure swabs, and parallel detection was also conducted using corresponding virus detection methods for comparison. The detection rates of porcine epidemic diarrhea virus, porcine deltacoronavirus, and hepatitis E virus in pork products and exports were all 0%, which was consistent with the results of the corresponding virus detection methods. The detection rates of the three viruses (PEDV, PDCoV, and HEV) using this method were 1.06%, 3.19% and 0.35%, respectively. The detection rates of the standard method for these three viruses were 1.06%, 3.19% and 0%, respectively. The study showed that the established triplex qPCR detection method can accurately and rapidly detect three viruses in pork and its products or pig samples, providing technical support for ensuring the market circulation of fresh pork and its products and blocking the transmission of viral foodborne diseases.

**Key words:** pork; hepatitis E virus (HEV); porcine epidemic diarrhea virus (PEDV); porcine delta corona virus (PDCoV); triple real-time quantitative PCR

作为猪肉生产和消费大国,我国动物源性疾病对猪肉产量和价格造成不同程度的影响,给进出口贸易带来了巨大冲击。2018 年以来,在非洲猪瘟、戊型肝炎等以猪为宿主的病毒感染,以及新冠疫情的冲击下,我国 2020 年第一季度猪肉产量下降 29.1%, 整年猪肉平均价格高达 46.83 元/kg<sup>[1]</sup>, 给居民猪肉消费带来巨大压力。其次,戊型肝炎、冠状病毒等人兽共患病所引发的重大食源性疾病对动物源性食品安全乃至人类公共卫生安全产生了巨大威胁。2016 年,据估计,每年全世界有 6 亿人(几乎每 10 人中就有 1 人)因食用受污染的食品而患病,并有 42 万人死亡<sup>[2]</sup>。因此,在生鲜猪肉及其制品流通环节,建立快速准确的检测病毒方法,切断病毒传染源,对猪肉品质保障、动物源性疾病防控与食品安全检测具有现实意义。

戊型肝炎病毒(Hepatitis E virus, HEV)和冠状病毒(Coronaviruses, CoVs)为典型的人兽共患病病原,而猪流行性腹泻病毒(Porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)和猪  $\delta$  冠状病毒(Porcine delta corona virus, PDCoV)为冠状病毒属,与猪的急性腹泻密切相关。根据基因组核苷酸序列差异,HEV 可被分为八种基因型(G1~G8),其中 G3 和 G4 为典型的人兽共患病病原<sup>[3]</sup>。研究表明食用 HEV 感染的猪肉及其制品可导致 G3 和 G4 传播。西班牙一户人家以猎杀野猪为食导致 G3 戊型肝炎感染<sup>[4]</sup>;荷兰一项研究在肝脏及其制品中均检出 HEV 核酸阳性<sup>[5]</sup>。研究显示 HEV 也存在于生血制品和用作食品添加剂的血液蛋白等其他生猪肉消费品中<sup>[6]</sup>。可见,食用猪肝等猪肉及制品存在 HEV 感染风险。PEDV 1971 年首次出现在英国的育肥猪群中,20 世纪 80 年代,猪流行性腹泻(Porcine epidemic diarrhea, PED)在日本、韩国、印度<sup>[7]</sup>、泰国<sup>[8]</sup>等亚洲多国发生大规模流行,2013 年美国发生 PED 疫情,并快速传播至 14 个州<sup>[9-10]</sup>,严重影响全美的猪肉供应链。PDCoV 又称为猪丁型冠状病毒和猪三角洲病毒,2014 年首次在美国俄亥俄州某猪场发现<sup>[11]</sup>,随后美国其他州的猪场同样检测到该病毒,迅速引起了生猪养殖行业的重

视。目前该病的发病率呈逐年上升趋势,已在美国、加拿大、墨西哥、越南、老挝、泰国、日本、韩国、中国等地均有检出,给生猪养殖行业造成巨大经济损失<sup>[12]</sup>。另外,研究表明 PDCoV 具备跨物种传播的能力,可造成鸡、犊牛和鸟类的感染<sup>[13-14]</sup>,而猪与人类和其他野生动物接触相对频繁,使其极可能成为潜在的人兽共患病病毒中间宿主<sup>[15]</sup>。

HEV、PEDV 和 PDCoV 均以猪作为易感宿主,三种病毒可造成猪肉及其制品病原微生物污染,人类食用被污染的肉类食品可感染相关疾病,且其继发细菌感染存在导致人类食物中毒的风险。而 HEV 和冠状病毒(Coronaviruses, CoVs)为典型的人兽共患病病原,PEDV 和 PDCoV 均为冠状病毒属,存在通过猪肉、猪内脏及其制品增加人类感染病毒的风险。另外,PEDV 和 PDCoV 是引起猪病毒性腹泻的主要病原,对新生仔猪危害最为严重,且两种病毒在临床症状、病理变化和流行病学等方面极为相似,呈混合感染<sup>[16]</sup>。自 2021 年境外预检首次检出猪戊型肝炎后,全国海关强化国门生物安全监测机制,严防动物疫病输入,加强了对国外进口生猪样品中 HEV、PEDV 和 PDCoV 等动物源性食品疾病的监测<sup>[17]</sup>。目前,PCR 检测技术在动物源性食品疫病检测中的应用相当普遍,且对一种或两种动物疫病病原的检测方法已趋于稳定。有大量学者建立了 HEV 单重 qPCR 检测方法<sup>[18-20]</sup>,且 PCR 技术在 PEDV 和 PDCoV 混合感染检测应用广泛<sup>[7,16,21-23]</sup>,但对该三种病毒的同时检测研究较少。而目前三种病毒的单重 qPCR 方法检测耗时长,消耗试剂成本高。因此建立一种同时诊断这三种病毒的高灵敏度、快速检测方法,为预防和阻断 HEV、PEDV 和 PDCoV 的食源性传播提供技术支撑,实现从食品原料源头上控制和保障其食用安全,保障猪肉及其制品的消费,降低肉类进出口贸易严重的经济损失,促进国际贸易发展。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

猪肉罐头 173 份、冷冻猪肉样品(包括冻猪肉、罐头原料肉、冷冻猪背膘、冷冻猪皮和猪脚等)

55份、猪肉肠,猪肉粒和猪肉片20份 总共248份样品,2021年12月份到2022年3月份期间成都海关技术中心收到的送检样品;养殖场生猪粪拭子样品282份 样本核酸均保存于成都海关技术中心实验室-80℃超低温冰箱;HEV阳性样本 由西南民族大学实验室和中国疾控中心提供;非洲猪瘟病毒(African swine fever virus, ASFV)、猪瘟病毒(Classical swine fever virus, CSFV)、口蹄疫病毒(Foot-and-mouth disease virus, FMDV)、伪狂犬病病毒(Pseudorabies virus, PRV)、猪圆环病毒2型(Porcine circovirus-2, PCV-2)、猪圆环病毒3型(Porcine circovirus-3, PCV-3)、猪细小病毒(Porcine parvovirus infection virus, PV)、猪传染性胃肠炎病毒(Porcine transmissible gastroenteritis virus, TGEV)、塞尼卡谷病毒(Seneca valley virus, SVV)、猪蓝耳病毒(Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus, PRRSV)阳性质粒或疫苗 由成都海关技术中心实验室保存;QIAcuity™ Probe PCR Kit、QIAcuity® One-Step Viral RT-PCR Kit、质粒小提试剂盒 QIAGEN 凯杰企业管理上海有限公司; pUC57 Simple TA/平端通用克隆载体(含感受态) 海基生物科技有限公司; SsoAdvanced Universal Probes Super mix 伯乐生命医学产品上海有限公司; MagPure Viral DNA/RNA Mini LQ Kit 广州美基生物科技有限公司; One Step Prime Script™ RT-PCR Kit (Perfect Real Time) TAKARA 宝生物工程有限公司。

实时荧光定量PCR仪、高速冷冻离心机XR3、ML蛋白纯化与核酸提取仪、恒温混匀仪 美国赛默飞世尔科技公司; QIAcuity Four PCR仪 QIAGEN 凯杰企业管理上海有限公司; 全自动凝胶图像分析系统 美国UVP公司; 生物安全柜 Biotech公司; 电子天平 德国赛多利斯公司; NanoDrop ONEC超微量核酸蛋白仪 德国Eppendorf艾本德中国公司; 冷冻研磨仪 上海净信实业发展有限公司。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 引物探针的设计与合成 在GenBank中查找

下载HEV的多个候选基因序列,通过DNAMAN和MegaAlign软件进行基因序列比对,筛选出特异性片段,利用Primer 6.0软件设计多对引物和探针,将设计好的引物探针交予生工上海生物工程有限公司合成。PEDV引物探针序列参照标准SN/T 1699-2017《猪流行性腹泻检疫技术规范》,PDCoV引物探针序列参照标准SN/T 5124-2019《猪Delta冠状病毒检疫技术规范》,序列详细信息见表1。

1.2.2 阳性质粒制备 PEDV和PDCoV的阳性质粒参照各自的基因序列(GenBank登录号分别为MT787025.1和OK546242.1)由生工生物公司合成。用美基公司的MagPure Viral DNA/RNA Mini LQ Kit试剂盒提取戊型肝炎病毒核酸,扩增目的片段。反应体系参照One Step TB Green® PrimeScript™ RT-PCR Kit (Perfect Real Time)试剂盒说明书,反应程序为:逆转录42℃,5 min,95℃,10 s;95℃预变性3 min;95℃变性10 s,60℃退火30 s,72℃延伸30 s,40个循环,72℃延伸10 min;16℃保存。PCR产物经1%琼脂糖电泳检测,按照Takara Mini BEST Agarose Gel DNA Extraction Kit胶回收试剂盒进行切胶回收处理,随后按照pUC57 Simple TA/平端通用克隆载体(含感受态)操作说明书将目的片段连接到pUC57载体上。最后将连接产物转化至RTS DH5α感受态细胞,扩大培养后PCR验证、测序鉴定,测序结果在NCBI上进行BLAST分析,序列正确的即为所需阳性质粒。将制备成功的质粒用质粒小提试剂盒提取后核酸蛋白仪测定质粒浓度,计算拷贝数。冻存至-80℃待用。

$$\text{DNA拷贝数} = \frac{\text{质粒DNA浓度} \times 6.02 \times 10^{23} \times 10^{-9}}{(\text{载体长度} + \text{目的片段长度}) \times 660}$$

1.2.3 病毒RNA提取 样品前处理参考文献[24]。猪肉制品:用剪刀多点挑取非脂肪、非结缔组织部分样品3.0 g置于15 mL匀浆管中,对于调料较多的罐头和猪肉肠样品,先加入4 mL PBS清洗样品3次,去除漂浮油脂和调味品等杂质,后加入4.5 mL PBS颠倒混匀,用冷冻研磨仪匀浆,确保样品组织完全破碎,反复冻融3次,使病毒充分释放到PBS中,

表1 引物与探针序列

Table 1 Primer and probe sequences

引物探针	序列(5'~3')	位置	产物长度(bp)
HEV-F	CTCTCGGGCTCTTCTGTT	5187-5204	
HEV-R	GGTTGGTTGGATGAATATAGG	5342-5362	
HEV-P	CY5-TGACCGGGTTGATTCTCAGCCCTTCGCCCTCC-BHQ2	5310-5341	171
PEDV-F	AACGCTAACACTCCTTAG	26106-26123	
PEDV-R	GAAGCATTGACTGAACGAC	26255-26237	
PEDV-P	FAM-TGTACGCCAGTAGCAACCTTATAGCC-BHQ2	26143-26168	150
PDCoV-F	CGACCACATGGCTCCAATTC	23406-23425	
PDCoV-R	CAGTCTTGGCCCATGTAGCTT	23475-23455	
PDCoV-P	ROX-CACACCAGTCGTTAAGCATGGCAAGC-BHQ2	23427-23452	70

注:表中HEV、PEDV、PDCoV引物探针标示位置分别以GenBank中登录号JX855794.1 ORF3基因,登录号MT787025.1 M蛋白基因和登录号OK546242.1 M蛋白基因作为参照。

5000 r/min 离心 5 min 后备用。生猪粪拭子样品:首先,制备 10% 的粪便悬液,取粪便标本 0.1 g 至 1.5 mL EP 管中,加入 0.9 mL PBS, pH 调至 7.2, 涡旋振荡 3 次,每次 10 s。静置 10 min 后,以 8000 r/min 转速离心 10 min, 吸取上清至新的 1.5 mL EP 管中备用。

核酸提取:吸取处理好的样品上清液 200  $\mu$ L, 按照 Mag Pure Viral DNA/RNA Mini LQ Kit 提取试剂盒说明书操作,用 KingFisher ML 核酸提取仪提取病毒 RNA。

1.2.4 三重 qPCR 方法体系建立及优化 根据 One Step PrimeScript™ RT-PCR Kit (Perfect Real Time) 试剂盒说明书进行 HEV、PEDV 和 PDCoV 三重 qPCR 反应,反应体系和程序参照前期预实验单重 qPCR 优化好的体系和程序,程序为:预变性 95  $^{\circ}$ C, 10 s; 变性 95  $^{\circ}$ C, 10 s, 退火延伸 58  $^{\circ}$ C, 30 s, 45 个循环收集荧光。在此基础上,进一步对设计的三对引物,用合成的阳性质粒进行反应程序和引物探针浓度优化。对退火温度(52、54、56、58、60、62  $^{\circ}$ C),引物浓度(HEV、PEDV 引物浓度 10  $\mu$ mol/L, PDCoV 引物浓度 5  $\mu$ mol/L, 使用量 0.2、0.4、0.5、0.6、0.8、1.0、1.2  $\mu$ L), 探针浓度(HEV、PEDV 探针浓度 10  $\mu$ mol/L, 使用量 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2  $\mu$ L; PDCoV 探针浓度 5  $\mu$ mol/L, 使用量 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.5  $\mu$ L)进行反应条件优化(见表 2),再将三种病毒各自最优的引物探针浓度交叉组合后进行反应,确定三重 qPCR 的最佳反应条件。

表 2 HEV PEDV PDCoV 三重 qPCR 优化反应体系  
Table 2 HEV PEDV PDCoV triple qPCR optimization reaction system

名称	体积( $\mu$ L)
SsoAdvanced Universal Probes Supermix	12.5
PEDV-F(10 $\mu$ mol/L)	0.2~1.2
PEDV-R(10 $\mu$ mol/L)	0.2~1.2
PEDV-P(10 $\mu$ mol/L)	0.1~1.2
PDCoV-F(5 $\mu$ mol/L)	0.2~1.2
PDCoV-R(5 $\mu$ mol/L)	0.2~1.2
PDCoV-P(5 $\mu$ mol/L)	0.2~1.5
HEV-F(10 $\mu$ mol/L)	0.2~1.2
HEV-R(10 $\mu$ mol/L)	0.2~1.2
HEV-P(10 $\mu$ mol/L)	0.1~1.2
模板	3.0
RNase Free H <sub>2</sub> O	补足至 25.0 $\mu$ L

1.2.5 三重 qPCR 方法特异性试验 提取 ASFV、CSFV、FMDV、PRV、PCV2、PCV3、PPV、TGEV、SVV、PRRSV 病毒核酸作为模板,加入 HEV、PEDV 和 PDCoV 的混合阳性质粒,并以 RNase Free H<sub>2</sub>O 为阴性对照,使用已优化好的反应条件进行三重 qPCR 反应,验证 HEV、PEDV 和 PDCoV 三重 qPCR 方法的特异性。

### 1.2.6 三重 qPCR 方法敏感性试验和标准曲线绘制

将 HEV、PEDV、PDCoV 阳性质粒按照体积比 1:1:1 混合后,连续 10 倍梯度稀释,再 2 倍稀释,设置阴性对照,确定三重 qPCR 方法最低检测限,与标准方法<sup>[24-26]</sup>进行比对。然后选用 6 个点,用 Applied Biosystems® QuantStudio®5 荧光定量 PCR 仪配套软件绘制三重 qPCR 方法标准曲线,并进行线性回归分析。

1.2.7 三重 qPCR 方法重复性试验 将 HEV、PEDV、PDCoV 混合阳性质粒进行连续 10 倍倍比稀释,选取 10<sup>6</sup>、10<sup>5</sup>、10<sup>4</sup> 和 10<sup>3</sup> copies/ $\mu$ L 的 4 个不同浓度梯度重组质粒进行三重 qPCR 重复试验,每个浓度的模板分别进行批内重复和批间重复试验,每个浓度重复 3 次,评估所建立方法的重复性。

### 1.2.8 人工污染猪肉样品检测

1.2.8.1 样品处理方法 在 2.5 cm $\times$ 2.5 cm $\times$ 2.5 cm 的小块切割肉表面选取 4 个注射点,将 100  $\mu$ L 10<sup>4</sup>、10<sup>3</sup>、10<sup>2</sup> copies/ $\mu$ L 三个稀释浓度的 HEV、PEDV 和 PDCoV 混合阳性质粒核酸提取液分别用注射器注射到三份小块切割肉中,后放于 4  $^{\circ}$ C, 2 h 以上增加病毒附着量。将污染的三个罐头原料肉样品分别置于 3 支 50 mL 离心管中,加入 PBS 研磨成匀浆液,5000 r/min 离心 5 min,取上清液 200  $\mu$ L,按照 MagPure Viral DNA/RNA Mini LQ Kit 提取试剂盒说明书操作,用 KingFisher ML 核酸提取仪提取病毒 RNA,核酸置于-80  $^{\circ}$ C 保存。每个浓度重复 3 次,同时以未污染的罐头原料肉样品作为阴性对照。

1.2.8.2 人工污染样品病毒回收率计算 用建立的三重 qPCR 检测方法分别对不同浓度污染的切割肉病毒核酸和混合阳性质粒核酸进行检测,每个浓度重复 3 次,计算病毒回收率。回收率计算如下:

$$\text{病毒回收率(\%)} = \frac{\text{提取病毒基因拷贝数}}{\text{添加病毒基因拷贝数}} \times 100$$

1.2.9 实际样本检测 对 2021 年 12 月份到 2022 年 3 月份期间成都海关技术中心收到的 248 份猪肉及制品和 282 份各养殖场种猪粪拭子样本核酸用三重 qPCR 方法和标准检测方法平行检测,同时以 10<sup>6</sup> copies/ $\mu$ L 的阳性混合质粒为阳性对照, RNase Free H<sub>2</sub>O 为阴性对照。对结果进行比较分析,评价该方法的实用性。

### 1.3 数据处理

采用 DNAMAN 和 Megalign 软件进行序列比对, Premier 6.0 进行引物设计。重复性验证结果和回收率采用 SPSS 软件进行均数方差分析和 ANOVA 分析;退火温度优化数据 SPSS 软件分析后采用 Origin 绘制图像;qPCR 图像处理采用 CFX-Manager 荧光定量 PCR 仪 Bio-Rad 配套软件和 Applied Biosystems® QuantStudio®5 荧光定量 PCR 仪配套软件进行分析处理。

## 2 结果与分析

### 2.1 阳性质粒制备

HEV、PEDV 和 PDCoV 三种病毒阳性质粒浓度及其拷贝数见表 3。

表 3 质粒浓度及拷贝数

Table 3 Calculation of plasmid concentration and copy number

名称	质粒长度(bp)	质粒浓度(ng/μL)	拷贝数(copies/μL)
HEV	2881	19.0	$6.02 \times 10^9$
PEDV	2860	22.1	$6.98 \times 10^9$
PDCoV	2780	21.0	$6.92 \times 10^9$

### 2.2 三重 qPCR 反应体系的优化

2.2.1 退火温度优化 HEV、PEDV 和 PDCoV 三重 qPCR 退火温度优化显示, 在 52~62 °C 区间设定 6 个温度梯度间 Ct 值存在显著性影响 ( $P < 0.05$ ) (图 1), 在退火温度 58 和 62 °C 时, HEV、PEDV 和 PDCoV 三种病毒 Ct 值较小, 再比较荧光信号强度, 在退火温度 58 °C 时, 三种病毒 Ct 值较小荧光强度最高(图 2)。综合考虑得出最优温度 58 °C, 在该

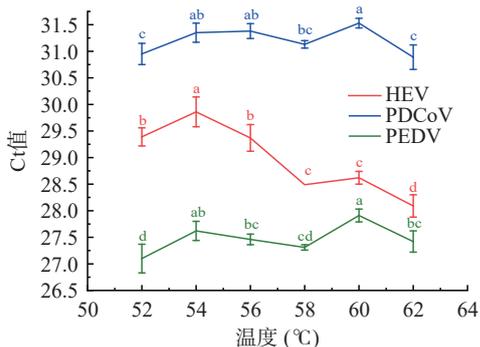


图 1 不同退火温度下三重 qPCR 扩增 Ct 值结果

Fig.1 Results of Ct values and significance of triple qPCR amplification under different annealing temperatures

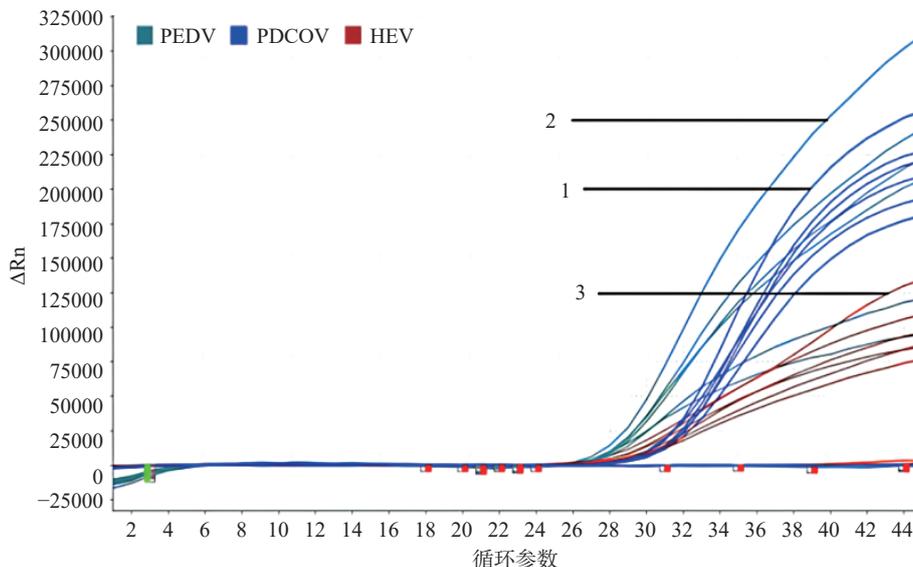


图 2 最佳退火温度条件下三重 qPCR 扩增结果

Fig.2 Triple-qPCR amplification results of optimal annealing temperature

注: 图中 1, 2, 3 分别代表退火温度为 58 °C 时, HEV、PEDV 和 PDCoV 三种病毒的扩增曲线。

退火温度下, 荧光信号强扩增曲线平滑且 Ct 值较低。三重 qPCR 的反应程序为: 42 °C, 5 min; 95 °C, 10 s; 95 °C, 10 s, 58 °C, 45 s, 45 个循环。

2.2.2 引物探针浓度优化 首先固定 PEDV 和 PDCoV 两种病毒的引物探针浓度, 根据 HEV 扩增曲线 Ct 值、扩增效率、荧光信号强度选出 HEV 最优的两对引物探针浓度组合 (10 μmol/L, 1.0 μL, 1.0 μL; 10 μmol/L, 1.0 μL, 0.8 μL), 同样方法选出 PEDV 和 PDCoV 最优的两对引物探针浓度组合 (PEDV: 10 μmol/L, 0.5 μL, 0.2 μL; 10 μmol/L, 1.0 μL, 0.5 μL, PDCoV: 5 μmol/L, 1.0 μL, 0.5 μL; 5 μmol/L, 0.8 μL, 0.4 μL)。再将三种病毒各自最优的两对引物探针浓度交叉组合后进行反应, 选出对三种病毒 Ct 值和荧光信号强度影响最小的组合。三种病毒引物探针优化结果扩增图见图 3, Ct 值见表 4, 确定三重 qPCR 的最佳反应体系如表 5。

2.2.3 三重 qPCR 特异性验证 将上述已建立好的三重 qPCR 检测方法用于其他 10 种相关病毒检测, 结果显示, 只有 HEV、PEDV、PDCoV 有阳性扩增曲线, 其余 10 种病毒 (ASFV、CSFV、FMDV、PRV、PCV2、PCV3、PPV、TGEV、SVV、PRRSV) 和阴性对照均无扩增曲线(图 4), 表明建立的三重 qPCR 检测方法具有良好特异性。

2.2.4 三重 qPCR 灵敏度和标准曲线 选用 HEV、PEDV 和 PDCoV 混合阳性质粒 (浓度分别为  $6.02 \times 10^7 \sim 6.02 \times 10^0$ 、 $6.98 \times 10^7 \sim 6.98 \times 10^0$  和  $6.92 \times 10^7 \sim 6.92 \times 10^0$  copies/μL) 8 个梯度作为模板, 使用已优化好的方法进行三重 qPCR 反应, 结果显示, 三种病毒浓度最低均能检测到  $10^0$  copies/μL (图 5)。再将  $10^0$  copies/μL 混合阳性质粒梯度二倍稀释 (HEV、PEDV 和 PDCoV 阳性质粒浓度分别为 6.02、3.01、

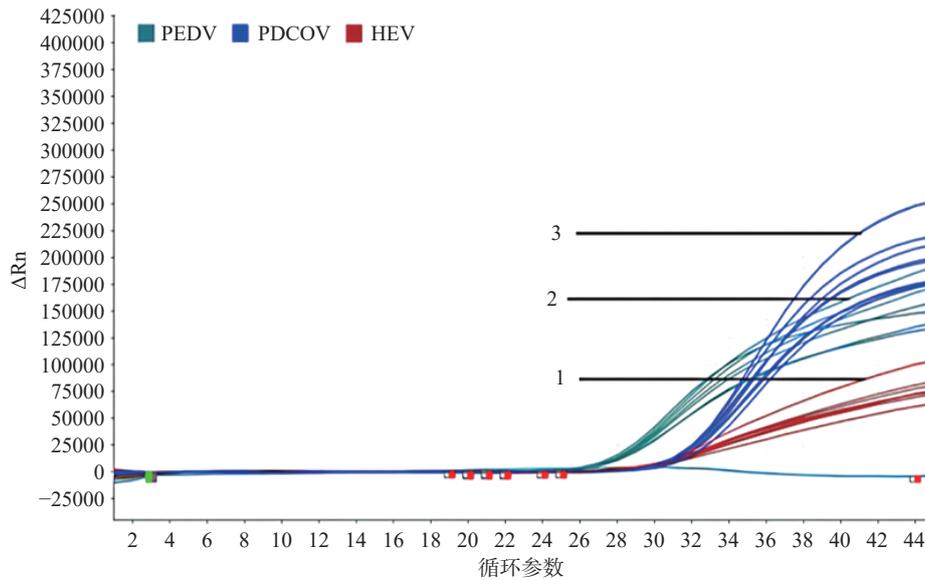


图 3 HEV、PEDV 和 PDCoV 三重 qPCR 引物探针优化结果

Fig.3 Optimization results of Triple qPCR primers and probes for HEV, PEDV, and PDCoV

注: 图中 1, 2, 3 分别代表 HEV、PEDV 和 PDCoV 最优引物探针组合下, 三种病毒的扩增曲线。

表 4 HEV、PEDV 和 PDCoV 三重 qPCR 引物探针优化结果(Ct 值)

Table 4 Optimization results of triple qPCR primer probes for HEV, PEDV, and PDCoV (Ct value)

组别	HEV-F, R, P 体积(μL)	PEDV-F, R, P 体积(μL)	PDCoV-F, R, P 体积(μL)	Ct值		
				HEV	PEDV	PDCoV
1	1.0, 1.0, 0.8	1.0, 1.0, 0.5	1.0, 1.0, 0.5	30.02	26.79	30.58
2	1.0, 1.0, 0.8	1.0, 1.0, 0.5	0.8, 0.8, 0.4	29.72	26.80	30.32
3	1.0, 1.0, 0.8	0.5, 0.5, 0.2	1.0, 1.0, 0.5	29.53	26.33	30.05
4	1.0, 1.0, 0.8	0.5, 0.5, 0.2	0.8, 0.8, 0.4	29.33	26.83	30.31
5	1.0, 1.0, 1.0	1.0, 1.0, 0.5	1.0, 1.0, 0.5	30.92	26.79	30.40
6	1.0, 1.0, 1.0	1.0, 1.0, 0.5	0.8, 0.8, 0.4	28.91	26.32	30.43
7	1.0, 1.0, 1.0	0.5, 0.5, 0.2	1.0, 1.0, 0.5	29.03	25.93	29.99
8	1.0, 1.0, 1.0	0.5, 0.5, 0.2	0.8, 0.8, 0.4	28.85	25.79	29.95

注: 表中F表示正向引物, R表示反向引物, P表示探针, HEV和PEDV的引物探针浓度均为10 μmol/L, PDCoV的引物探针浓度为5 μmol/L。

表 5 HEV PEDV PDCoV 三重 qPCR 反应体系

Table 5 HEV PEDV PDCoV triple qPCR reaction system

名称	体积(μL)
2×One Step RT-PCR Buffer III	12.5
Ex Taq HS	0.5
PrimeScript RT Enzyme Mix II	0.5
HEV-F(10 μmol/L)	1.0
HEV-R(10 μmol/L)	1.0
HEV-P(10 μmol/L)	1.0
PEDV-F(10 μmol/L)	0.5
PEDV-R(10 μmol/L)	0.5
PEDV-P(10 μmol/L)	0.2
PDCoV-F(5 μmol/L)	0.8
PDCoV-R(5 μmol/L)	0.8
PDCoV-P(5 μmol/L)	0.4
模板	3.0
RNase Free H <sub>2</sub> O	补足至25.0 μL

1.505 copies/μL, 6.98、3.49、1.295 copies/μL 和 6.92、3.46、1.73 copies/μL), 进行三重 qPCR 反应, 直至无

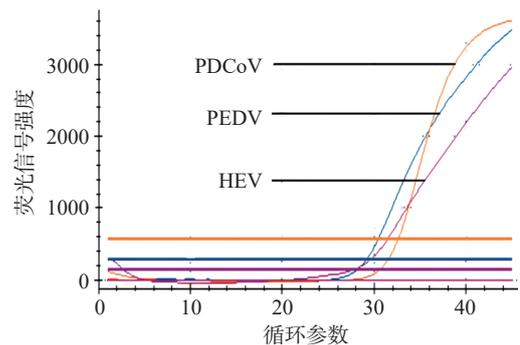


图 4 HEV、PEDV 和 PDCoV 三重 qPCR 特异性试验

Fig.4 HEV, PEDV and PDCoV fluorescence of triple qPCR specificity test

稳定曲线扩增。结果表明, 三重 qPCR 检测方法中, HEV 阳性质粒检测限为 6.02 copies/μL, PEDV 阳性质粒检测限为 6.98 copies/μL, PDCoV 阳性质粒检测限为 6.92 copies/μL, 低于该浓度无扩增曲线且无法收集到相关荧光信号。

绘制标准曲线结果显示(图 6), 在核酸拷贝数

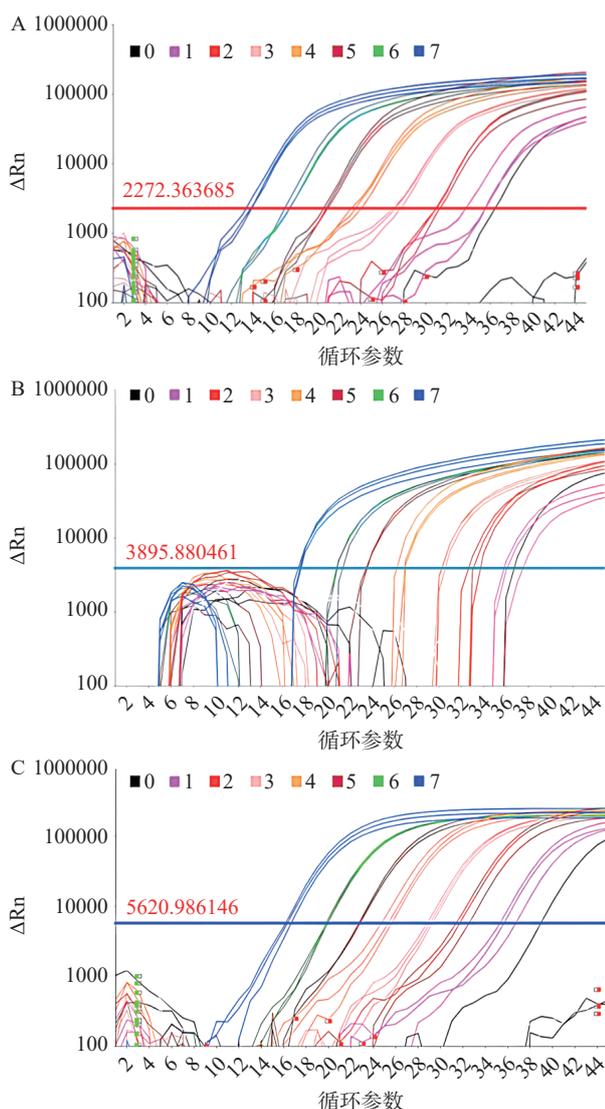


图5 HEV、PEDV 和 PDCoV 三重 qPCR 的灵敏度

Fig.5 Sensitivity of triple-qPCR of HEV, PEDV and PDCoV  
 注:图 A 中图注 0~7 分别代表 HEV 质粒拷贝数为  $6.02 \times 10^7 \sim 6.02 \times 10^0$  copies/ $\mu$ L; 图 B 中图注 0~7 分别代表 PEDV 质粒拷贝数为  $6.98 \times 10^7 \sim 6.98 \times 10^0$  copies/ $\mu$ L; 图 C 中图注 0~7 分别代表 PDCoV 质粒拷贝数为  $6.92 \times 10^7 \sim 6.92 \times 10^0$  copies/ $\mu$ L。

$10^7 \sim 10^2$  copies/ $\mu$ L 范围内,三种病毒标准曲线均呈良好线性关系。HEV、PEDV 和 PDCoV 线性决定系数 ( $R^2$ ) 分别为 0.999、0.996 和 0.993; 三种病毒引物扩增效率(E)分别为 94.16%、113.56%和 112.15%。

2.2.5 三重 qPCR 重复性验证 以  $10^6$ 、 $10^5$ 、 $10^4$ 、 $10^3$  copies/ $\mu$ L 的 HEV、PEDV、PDCoV 混合阳性质粒作为模板,进行了批内重复和批间重复试验。检测结果各组平行数据标准差(SD)均小于 0.4,集中趋势好,组内和组间变异系数(CV%)均在 0.10%~3.00%之间,可见建立的三重 qPCR 检测方法重复性以及稳定性好(表 6)。

2.2.6 人工污染猪肉的检测结果 用  $10^4$ 、 $10^3$ 、 $10^2$  copies/ $\mu$ L 三个浓度的 HEV、PEDV 和 PDCoV 混合阳性质粒核酸对罐头原料肉人工污染,评价三重 qPCR 方法在食品中的检测效果。结果显示,

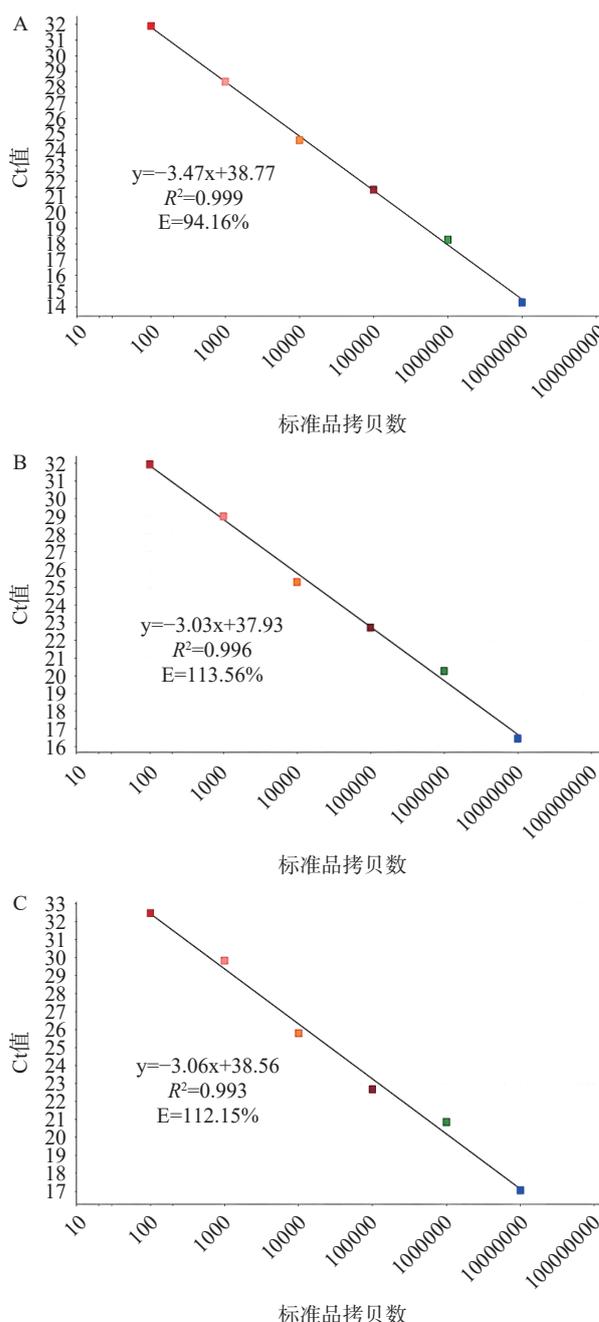


图6 HEV、PEDV 和 PDCoV 三重 qPCR 标准曲线

Fig.6 Standard curve of triple-qPCR of HEV, PEDV and PDCoV

注: A. HEV 标准曲线; B. PEDV 标准曲线; C. PDCoV 标准曲线。

HEV、PEDV 和 PDCoV 三种病毒不同污染浓度的回收率满足方差齐性 ( $P=0.285$ ,  $P=0.580$ ,  $P=0.613 > 0.05$ ), 选用单因素 ANOVA 检验-LSD 法进行两两比较,三种病毒回收率在任意两种污染浓度之间的差异均存在统计学意义 ( $P < 0.05$ ) (表 7)。可见,三种病毒在不同的污染浓度的食品中回收率均较好,均能被稳定检测。

2.2.7 实际样品检测结果 同时用 SN/T 4235-2015、SN/T 1699-2017 和 SN/T 5124-2019 标准检测方法、建立好的三重 qPCR 检测方法对 2021 年 12 月份到 2022 年 3 月份期间成都海关技术中心收

表 6 HEV、PEDV 和 PDCoV 三重 qPCR 重复性验证  
Table 6 HEV, PEDV and PDCoV triplex qPCR repeatability test

样品类型	样品浓度(copies/μL)	批内重复实验(Ct 值)			组内变异系数CV(%)	批间重复实验(Ct 值)			组间变异系数CV(%)
		1	2	3		1	2	3	
HEV	6.02×10 <sup>6</sup>	18.24	18.28	17.99	0.86	18.78	18.91	18.82	2.06
	6.02×10 <sup>5</sup>	21.47	21.66	21.82	0.81	22.08	22.23	22.17	1.39
	6.02×10 <sup>4</sup>	24.62	24.56	23.99	1.43	25.58	25.56	25.49	2.68
	6.02×10 <sup>3</sup>	28.35	28.54	28.00	0.97	28.99	29.07	29.01	1.52
PEDV	6.98×10 <sup>6</sup>	20.26	20.50	19.97	1.31	20.81	20.86	20.97	1.90
	6.98×10 <sup>5</sup>	22.71	22.82	23.01	0.66	23.59	23.60	23.66	1.86
	6.98×10 <sup>4</sup>	25.29	25.04	25.40	0.73	26.59	26.04	26.40	2.48
	6.98×10 <sup>3</sup>	29.00	28.87	28.91	0.23	30.00	30.12	30.01	2.08
PDCoV	6.92×10 <sup>6</sup>	20.85	20.83	20.69	0.42	21.58	21.53	21.64	2.07
	6.92×10 <sup>5</sup>	22.69	22.58	22.50	0.42	23.67	23.38	23.42	2.20
	6.92×10 <sup>4</sup>	25.80	25.78	26.00	0.47	26.79	26.79	26.85	2.00
	6.92×10 <sup>3</sup>	29.84	29.98	29.84	0.27	30.06	30.08	30.13	0.42

表 7 三重 qPCR 方法对罐头原料肉不同污染浓度回收率  
Table 7 Recovery rate of different contamination concentration of canned raw meat by triple-qPCR method

病毒名称	回收率(%)		
	10 <sup>4</sup> copies/μL (n=3)	10 <sup>3</sup> copies/μL (n=3)	10 <sup>2</sup> copies/μL (n=3)
HEV	25.30±0.12 <sup>b</sup>	30.75±0.29 <sup>a</sup>	23.40±0.44 <sup>c</sup>
PEDV	21.89±0.48 <sup>b</sup>	29.17±0.32 <sup>a</sup>	20.67±0.48 <sup>c</sup>
PDCoV	27.51±0.47 <sup>b</sup>	32.94±0.84 <sup>a</sup>	25.26±0.45 <sup>c</sup>

注: a、b、c、表示同一行(不同污染浓度)之间的差异显著性, P<0.05。

表 8 三重 qPCR 和标准检测方法对实际样品的阳性检测结果

Table 8 Positive test results of triple qPCR on pig derived samples

样品名称	三重qPCR检测方法Ct值			标准检测方法Ct值		
	HEV	PEDV	PDCOV	HEV	PEDV	PDCOV
5-1H	N/A	N/A	36.90	N/A	N/A	38.16
5-2C	N/A	N/A	35.56	N/A	N/A	37.92
5-2E	N/A	N/A	37.28	N/A	N/A	38.17
5-3E	N/A	N/A	36.90	N/A	N/A	38.20
5-4B	N/A	N/A	36.97	N/A	N/A	38.34
5-9B	N/A	N/A	37.40	N/A	N/A	38.26
1-7E	37.64	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
1-7F	N/A	19.39	36.04	N/A	39.94	38.99
1-10H	N/A	39.61	38.15	N/A	36.01	39.08
1-12F	N/A	37.54	36.66	N/A	39.05	38.99
NC	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
POS	20.96	19.14	25.54	30.30	29.69	27.72

注: NC: 阴性对照; POS: 阳性对照; N/A: 检测结果对应目标基因无扩增曲线。

到的 248 份出口猪肉及其制品, 以及 282 份各养殖场的生猪粪拭子样品进行检测。检测结果显示, 在 248 份出口猪肉及其制品中, 标准检测方法、三重 qPCR 方法对 HEV、PEDV 和 PDCoV 三种病毒的检出率均为 0%; 在 282 份进口的生猪粪拭子样品中, 标准方法对 HEV、PEDV 和 PDCoV 三种病毒的检出率分别为 0%、1.06%、3.19%; 三重 qPCR 方法的检出率分别为 0.35%、1.06%、3.19%(表 8), 可见, 与标准检测方法相比, HEV 检出率得到了提升,

PEDV 和 PDCoV 检出率一致。

### 3 讨论与结论

动物源性食品中的动物疫病可以通过直接或间接污染动物源性食品, 对食品安全、养殖业发展以及人类健康和公共卫生安全构成严重威胁。WHO 调查显示, 75% 的动物疫病是人兽共患病, 其中有 70% 至少可以传染给一种动物<sup>[27]</sup>, 像戊型肝炎病毒、诺如病毒、轮状病毒等会造成人类食物中毒, 虽然目前我国已经成功研制了戊肝疫苗, 但并没有在市面上广泛应用, 若不断加强病毒传播的防范, 有可能成为我国消化道传播的主要病毒性肝炎。而冠状病毒中 α 和 β 属多为人兽共患病病毒, 最为典型的中东呼吸综合征病毒(MERS-CoV)和引起严重急性呼吸综合征病毒(SARS-CoV)都是从动物宿主中产生的。在北京市新冠肺炎疫情防控工作第 130 场新闻发布会上, 国家卫生健康委专家组专家、国家食品安全风险评估中心微生物实验室主任李凤琴介绍, 新冠病毒不会在食品之间传播, 但有可能被污染, 从新冠肺炎疫情严重的国家进口冷链食品表面和外包装都发现 SARS-CoV-2 污染<sup>[28]</sup>, 可见冷冻食品可能成为 CoVs 传播的媒介, 加重疫情形势。另外由于冠状病毒遗传物质单链 RNA 稳定性差且病毒基因组结构长, 不排除其他冠状病毒属经变异进化感染人类的可能性。

目前, 对 HEV、PEDV 和 PDCoV 三种病毒的检测多采用单重荧光定量和环介导等温扩增反应(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)等基因诊断技术, 多重 qPCR 检测方法的研究较少。在其他学者建立的检测方法中, TaqMan 荧光定量 RT-PCR 方法对 HEV 的检测灵敏度可达 2.0×10<sup>1</sup> copies/μL<sup>[19]</sup>; 对 PEDV 的 RT-PCR 方法检测限为 4×10<sup>4</sup> copies/μL<sup>[29]</sup>、实时荧光 RPA 等温检测方法<sup>[30]</sup>和 RT-LAMP 快速检测方法<sup>[31]</sup>灵敏度均为 2 copies/μL, 学者对 PDCoV N 基因建立荧光 RT-qPCR 方法检测限为 6.3 copies/μL<sup>[23]</sup>, TaqMan 探针 qPCR 方法检测极限 2.2 copies/μL<sup>[32]</sup>。本研究中, 三

重 qPCR 检测方法对三种病毒的最低检出限均能达到个位拷贝数,对 HEV、PEDV 和 PDCoV 三种病毒的最低检测限分别为 6.02、6.98、6.92 copies/ $\mu$ L。可见,该方法灵敏度较高,且有效规避了多重反应体系中多对引物探针的交互影响,将三种病毒相互间干扰降到最低。另外,HEV、PEDV和 PDCoV 三种病毒在生猪粪拭子样品中的检出率与出口猪肉罐头、罐头原料肉、冷冻猪肉样品等样品相比,阳性检出率明显提高。国外学者对不同种类的猪肉产品进行 HEV 检测结果显示,香肠、猪肝制品及冻猪皮等不同产品中 HEV 阳性率有一定差异,在以生猪肝为原料制备的猪肝酱中 HEV 阳性检出率远高于香肠中 HEV 阳性检出率<sup>[5,33-34]</sup>,可见猪肉经过加工成食品后,食品中病毒载量降低,且不同猪肉食品基质和热处理、腌制等加工处理方式都会对病毒载量产生影响,这与本研究得出结论相符。而 HEV 和冠状病毒等引起胃肠炎的病毒在环境中相当稳定,在无生命表面、手和干粪便的悬浮液中均可存活<sup>[35]</sup>。因此,本研究在提高猪肉及其制品检测效率的同时也保证了三种病毒的检出率,对预防和阻断 HEV、PEDV 和 PDCoV 三种病毒的食源性传播具有一定参考价值。

### 参考文献

- [1] 赵楷雯,张洪波. 新冠疫情期间居民猪肉消费行为分析[J]. 商展经济,2021(16): 62-64. [ ZHAO Kaiwen, ZHANG Hongbo. Analysis of residents' pork consumption behavior under the COVID-19 epidemic[J]. Business Exhibition Economics, 2021 (16): 62-64. ]
- [2] 世界卫生组织. 食品安全[EB/OL]. (2020-04-30)[2023-3-30]. <https://www.who.int/zh/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>. [ World Health Organization. Food safety[EB/OL]. (2020-04-30)[2023-3-30] <https://www.who.int/zh/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>. ]
- [3] KENNEY S P. The current host range of hepatitis E viruses[J]. *Viruses*, 2019, 11(5): 452.
- [4] RIVERO-JUAREZ A, FRIAS M, MARTINEZ-PEINADO A, et al. Familial Hepatitis E outbreak linked to wild boar meat consumption[J]. *Zoonoses and Public Health*, 2017, 64(7): 561-565.
- [5] BOXMAN I L A, JANSEN C C C, HÄGELE G, et al. Monitoring of pork liver and meat products on the Dutch market for the presence of HEV RNA[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2019, 296: 58-64.
- [6] BOXMAN I L A, JANSEN C C C, HÄGELE G, et al. Porcine blood used as ingredient in meat productions may serve as a vehicle for hepatitis E virus transmission-science direct[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2017, 257: 225-231.
- [7] BARMAN N N, BARMAN B, SARMA D K, et al. Prevalence of rotavirus, transmissible gastroenteritis virus and porcine epidemic diarrhoea virus antibodies in pigs of Assam, India[J]. *Indian Journal of Animal Sciences*, 2003, 73(6): 576-578.
- [8] PURANAVEJA S, POOLPERM P, LERTWATCHARASARAKUL P, et al. Chinese-like strain of porcine epidemic diarrhoea virus, Thailand[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2009, 15(7): 1112-1115.
- [9] MENG Fandan, REN Yudong, SUO Siqingaowa, et al. Evaluation on the efficacy and immunogenicity of recombinant DNA plasmids expressing spike genes from porcine transmissible gastroenteritis virus and porcine epidemic diarrhoea virus[J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e57468.
- [10] SHI Da, LYU Maojie, CHEN Jianfeng, et al. Molecular characterizations of subcellular localization signals in the nucleocapsid protein of porcine epidemic diarrhoea virus[J]. *Viruses*, 2014, 6(3): 1253-1273.
- [11] WANG Leyi, BYRUM B, ZHANG Yan. Porcine coronavirus HKU15 detected in 9 US States, 2014[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2014, 20(9): 1594-1595.
- [12] 陈建飞,王潇博,焦贺勋,等. 国内首株猪德尔塔冠状病毒(Porcine delta coronavirus)的分离鉴定[J]. 中国兽医学报,2016, 38(3): 171-174. [ CHEN Jianfei, WANG Xiaobo, JIAO Hexun, et al. Isolation and identification of the first Porcine delta coronavirus strain in China[J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2016, 38(3): 171-174. ]
- [13] JUNG K, HU H, SAIF L J. Calves are susceptible to infection with the newly emerged porcine deltacoronavirus, but not with the swine enteric alphacoronavirus, porcine epidemic diarrhoea virus[J]. *Archives of Virology*, 2017, 162(8): 2357-2362.
- [14] BOLEY P A, ALHAMO M A, LOSSIE G, et al. Porcine deltacoronavirus infection and transmission in poultry[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2020, 26(2): 255-264.
- [15] WEATHERMAN S, FELDMANN H, WIT E D, et al. Transmission of henipaviruses[J]. *Current Opinion in Virology*, 2017, 28: 7.
- [16] 李莎莎,纪立凯,王中华,等. 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): 6. [ LI Shasha, JI Likai, WANG Zhonghua, et al. Establishment and application of multiple PCR detection methods for porcine delta coronavirus, porcine epidemic diarrhoea virus, porcine transmissible gastroenteritis virus, and porcine rotavirus[J]. *Livestock and Veterinary Medicine*, 2020, 52 (9): 6. ]
- [17] 中华人民共和国海关总署. 2021 年海关强化监管优化服务守牢外防输入关口“国门绿盾”专项行动截获外来物种 8473 批次[EB/OL]. (2021-01-28)[2023-3-30]. <http://www.customs.gov.cn/customs/xwfb34/mtjj35/4150952/index.html>. [ General Administration of Customs of the People's Republic of China. Customs strengthened supervision and optimized services to guard against foreign imports. The “National Green Shield” special action intercepted 8473 batches of alien species in 2021[EB/OL]. (2021-01-28)[2023-3-30]. <http://www.customs.gov.cn/customs/xwfb34/mtjj35/4150952/index.html>. ]
- [18] 张亮权,欧阳昀,刘志刚,等. 检测猪戊型肝炎病毒的荧光定量 PCR 方法的建立[J]. 中国兽医杂志, 2011, 47(10): 16-18. [ ZHANG Liangquan, OUYANG Yun, LIU Zhigang, et al. Establishment of a fluorescence quantitative PCR method for detecting porcine hepatitis E virus[J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2011, 47 (10): 16-18. ]
- [19] 乔彩霞,张鹤晓,赖平安,等. 戊型肝炎病毒荧光定量 RT-PCR 快速检测技术的建立和初步应用[J]. 生物工程学报, 2008(5): 892-897. [ QIAO Caixia, ZHANG Hexiao, LAI Ping'an, et al. Establishment and preliminary application of fluorescence quantitative RT-PCR for rapid detection of hepatitis E virus[J]. *Journal of Biotechnology*, 2008 (5): 892-897. ]
- [20] 贡嘎,崔立. 戊型肝炎病毒感染检测方法的研究进展[J]. 畜牧与兽医, 2008, 40(5): 4. [ GONG Ga, CUI Li. Research progress in detection methods for hepatitis E virus infection[J]. *Ani-*

- mal Husbandry and Veterinary Medicine, 2008, 40 (5): 4. ]
- [ 21 ] 李儒曙, 苏惠龙, 蒋郁明, 等. 基于 Taqman 探针三重 Real-Time RT-PCR 检测 PEDV、TGEV、PoRV 方法的建立与应用[J]. 广东畜牧兽医科技, 2019, 44(5): 41-44. [ LI Rushu, SU Huilong, JIANG Yuming, et al. Establishment and application of a triple Real Time RT-PCR method based on Taqman probe for the detection of PEDV, TGEV, and PoRV[J] Guangdong Animal Husbandry and Veterinary Science and Technology, 2019, 44 (5): 41-44. ]
- [ 22 ] 逢凤娇, 张柏猛, 何孔旺, 等. 猪  $\delta$  冠状病毒 M 基因 RT-PCR 检测方法的建立及应用[J]. 畜牧与兽医, 2016(9): 4. [ PANG Fengjiao, ZHANG Baimeng, HE Kongwang, et al. pig  $\delta$  Establishment and application of a RT-PCR method for detecting coronavirus M gene[J] Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2016 (9): 4. ]
- [ 23 ] 张世亨, 黄海鑫, 尹彦文, 等. 猪德尔塔冠状病毒荧光定量 PCR 检测方法的建立与应用[J]. 中国兽医学报, 2019, 39(12): 2288-2292. [ ZHANG Shiheng, HUANG Haixin, YIN Yanwen, et al. Establishment and application of a fluorescence quantitative PCR method for detecting porcine delta coronavirus[J] Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2019, 39 (12): 2288-2292. ]
- [ 24 ] 广东出入境检验检疫局. SN/T 4235-2015 猪戊型肝炎技术规范[S]. 北京: 国家认证认可监督管理委员会, 2023. [ Guangdong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau. SN/T 4235-2015 Technical specification for porcine hepatitis E [S] Beijing: National Certification and Accreditation Administration, 2023. ]
- [ 25 ] 广东出入境检验检疫局. SN/T 1699-2017 猪流行性腹泻检疫技术规范[S]. 北京: 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 2023. [ Guangdong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau. SN/T 1699-2017 Technical specification for quarantine of porcine epidemic diarrhea [S] Beijing: General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, 2023. ]
- [ 26 ] 中华人民共和国杭州海关. SN/T 5124-2019 猪 Delta 冠状病毒检疫技术规范[S]. 北京: 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 2023. [ Hangzhou Customs of the People's Republic of China SN/T 5124-2019 Technical specification for quarantine of porcine delta coronavirus[S] Beijing: General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, 2023. ]
- [ 27 ] 夏成柱. 实验动物与人兽共患病[J]. 兽医导刊, 2011(11): 2. [ XIA Xianzhu. Experimental animal and zoonotic comorbidity[J] Veterinary Guide, 2011 (11): 2. ]
- [ 28 ] 中华人民共和国海关总署. 海关总署公告 2020 年第 103 号(对检出新冠病毒核酸阳性的进口冷链食品境外生产企业实施紧急预防性措施的公告)[EB/OL]. (2020-09-11)[2022-3-20]. <http://www.customs.gov.cn/customs/302249/302266/index.html>. [ General Administration of Customs of the People's Republic of China. Announcement No.103, 2020 of the General Administration of Customs (Announcement on Implementing Emergency Preventive Measures for Overseas Manufacturers of Imported Cold Chain Food with Positive Nucleic Acid of COVID-19) [EB/OL]. (2020-09-11)[2022-3-20]. <http://www.customs.gov.cn/customs/302249/302266/index.html>. ]
- [ 29 ] 秦毅斌, 卢冰霞, 赵武, 等. 猪流行性腹泻病毒变异毒株与经典毒株 RT-PCR 鉴别检测方法的建立及应用[J]. 中国兽医科学, 2014, 44(5): 509-514. [ [QIN Y B, LU B X, ZHAO W, et al. Development and applications of an RT-PCR method for differentiation between variant porcine epidemic diarrhea virus strains and classical strains[J]. Chinese Veterinary Science, 2014, 44(5): 509-514. ]
- [ 30 ] 吕继洲, 范燕茹, 冯春燕, 等. 猪流行性腹泻病毒实时荧光 RPA 等温检测方法的建立[J]. 中国畜牧兽医, 2017, 44(12): 3434-3439. [ LÜ Jizhou, FAN Yanru, FENG Chunyan, et al. Establishment of a real-time fluorescence RPA isothermal detection method for porcine epidemic diarrhea virus[J] China Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2017, 44 (12): 3434-3439. ]
- [ 31 ] 吴迪, 王林, 栗云鹏, 等. 猪流行性腹泻病毒 RT-LAMP 检测方法的建立与应用[J]. 中国兽药杂志, 2020, 54(5): 1-9. [ WU Di, WANG Lin, LI Yunpeng, et al. Establishment and application of RT-LAMP detection method for porcine epidemic diarrhea virus[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2020, 54(5): 1-9. ]
- [ 32 ] 秦毅斌, 何莘萍, 卢冰霞, 等. 猪丁型冠状病毒 TaqMan 实时定量 RT-PCR 检测方法的建立和应用[J]. 中国兽医科学, 2018, 48(6): 692-699. [ QIN Yibin, HE Pingping, LU Bingxia, et al. Development and application of a real-time TaqMan fluorescent quantitative RT-PCR assay for detection of porcine deltacoronavirus[J]. Chinese Veterinary Science, 2018, 48(6): 692-699. ]
- [ 33 ] SALINES M, ANDRAUD M, ROSE N, et al. From the epidemiology of hepatitis E virus (HEV) within the swine reservoir to public health risk mitigation strategies: A comprehensive review[J]. Veterinary Research, 2017, 48(1): 31.
- [ 34 ] MARTIN L S, HENNECHART C C, GUILLIER L, et al. Method for HEV detection in raw pig liver products and its implementation for naturally contaminated food[J]. International Journal of Food Microbiology, 2014, 176: 1-8.
- [ 35 ] LOPMAN B, REACHER M, DUIJNHOFEN Y V, et al. Viral gastroenteritis outbreaks in Europe, 1995-2000[J]. Emerging Infectious Diseases, 2003, 9(1): 90-96.