

郑晓文, 饶品彬, 蔡 晔, 等. EvaGreen 实时荧光 PCR 检测猪繁殖与呼吸综合征 (PRRSV) 方法的建立和应用[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(9): 123–126. doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.09.034

EvaGreen 实时荧光 PCR 检测猪繁殖与呼吸综合征 (PRRSV) 方法的建立和应用

郑晓文, 饶品彬, 蔡 晔, 杨宗歧, 姜永厚

(浙江理工大学生命科学院, 浙江杭州 310018)

摘要: 目前, 猪繁殖与呼吸综合征 (PRRS) 已成为全球范围内影响较广的猪类重要疾病之一, 因此建立快速、有效的猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) 检测技术成为预防和控制 PRRS 传播的关键。在序列分析的基础上, 设计特异性引物, 建立基于熔解曲线分析的 EvaGreen 实时荧光定量 PCR 检测 PRRSV 方法。该方法能够特异性扩增 PRRSV, 并用经熔解曲线分析产生特异性的熔解峰, 而非靶标病毒未产生非特异性扩增; PRRSV 的检测灵敏度可达 50 copies/ μL ; 批内、批间重复试验中变异系数均在 2% 以内; 对 118 份临床样品进行检测, 阳性率为 31.4%, 与普通 PCR 检测结果相符率为 100%。结果表明, 建立的 EvaGreen 实时荧光定量 PCR 检测 PRRSV 方法具有较高的特异性、灵敏度和良好的重复性, 可用于临床 PRRSV 感染的早期诊断及分子流行病学调查。

关键词: 猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV); EvaGreen 实时荧光定量 PCR; 熔解曲线分析; 检测

中图分类号: S855.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)09-0123-04

猪繁殖与呼吸综合征病毒别称蓝耳病病毒 (porcine reproductive and respiratory syndrome virus, 简称 PRRSV), 属动脉炎病毒科动脉炎病毒属, 是一种单股正链 RNA 病毒, 全基因组序列约为 15 kb, 含 9 个开放阅读框 (ORF), 其中 ORF_{1a}、ORF_{1b} 占整个病毒基因组的 80%, ORF_{1a} 编码的非结构蛋白 Nsp-2 蛋白在病毒复制和致病过程中发挥重要作用, ORF_{2a}、ORF_{2b}、ORF₃₋₇ 各自编码病毒结构蛋白 GP2、E、GP3、GP4、GP5、M、N^[1-3]。PRRSV 基因组毒株间具有较大的遗传变异性, 根据 PRRSV 基因型差异, 将 PRRSV 分为美洲型、欧洲型, 两者序列同源性约为 63%^[4-5]。

由 PRRSV 引起的猪繁殖与呼吸综合征 (猪蓝耳病) 是以仔猪呼吸衰竭和孕猪流产、胎儿畸变、早产、死产及木乃伊胎等繁殖障碍为主要症状的传染病^[6], 以高致病率、高死亡率为主要特征, 该病于 1987 年在美国首次被发现, 目前遍布世界各个养猪国家^[7-8]。1992 年世界动物卫生组织 (Office International Desepizooties, 简称 OIE) 将猪繁殖与呼吸综合征列为 B 类动物传染病, 我国将其列为二类动物疫病^[9]。我国于 1996 年首次报道该病, 主要为美洲型。2006 年, PRRSV 的高致病性 NA 型病毒株 (HP-PRRSV) 在我国各地养猪业中引起大规模疾病暴发, 给我国猪群养殖业带来了沉重的经济损失^[10-11]。因此, 建立及时快速的 PRRSV 检测方法, 对预防和控制该疫情有重要的作用。

目前用于诊断 PRRSV 的方法有病毒分离培养、间接免疫

荧光试验 (IFA)、酶联免疫吸附试验 (ELISA) 等, 这些检测手段存在耗时长、灵敏度低、对感染早期无法确诊等缺点。实时荧光定量 PCR (real-time fluorescent quantitative PCR, 简称 real-time PCR) 是一种自动化程度高、特异性强、灵敏度好、可以实时监测整个 PCR 进程的核酸检测技术, 包括荧光杂交探针、荧光染料 2 类^[12]。染料法实时定量 PCR 省去了设计、标记荧光探针等流程, 检测费用较探针法相对降低, 同时适用于各种 PCR 扩增体系^[13-14]。新型饱和染料 EvaGreen 具有很强的荧光信号和稳定性, 解决了 SYBR Green 染料重分布等缺点, 是一种适用于实时荧光定量 PCR 的 DNA 结合荧光染料^[15]。本研究拟建立 1 种基于 EvaGreen 的 PRRSV 实时荧光定量 PCR 检测方法, 应用于猪繁殖与呼吸综合征的早期诊断, 同时也可作为猪繁殖与呼吸综合征的诊断、试剂研发、流行病学研究等奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 病毒和临床样品 PRRSV、猪瘟病毒 (classical swine fever virus, 简称 CSFV) 及猪圆环病毒 2 型 (porcine circovirus type 2, 简称 PCV2) 疫苗株由笔者所在实验室保存; 猪细小病毒 (porcine parvovirus, 简称 PPV) 疫苗干粉, 购自北京中海保健科技有限公司; 伪狂犬病病毒 (pseudorabies virus, 简称 PRV)、日本脑炎病毒 (Japanese encephalitis virus, 简称 JEV) 疫苗干粉, 购自武汉科前动物生物制品有限公司。收集来自湖北省、福建省、安徽省、广东省、河南省、浙江省及天津等地猪场的共 58 份血清样品和在杭州市内不同猪肉市场收集的共 60 份包括猪肺、淋巴结、肝、肾等组织样品。

1.1.2 主要试剂及仪器 Taq DNA 聚合酶、dNTPs、蛋白酶 K 等, 购自 Sangon 公司; Ezol、RNase A、pMD18-T vector、RNase inhibitor、M-MuLV 反转录酶、Agarose 等, 购自 TaKaRa 公司;

收稿日期: 2016-02-02

基金项目: 浙江省自然科学基金 (编号: LY15C010006)。

作者简介: 郑晓文 (1988—), 男, 浙江衢州人, 硕士, 研究方向为微生物学。E-mail: 804360648@qq.com。

通信作者: 姜永厚, 博士, 副教授, 研究方向为病毒分子诊断与动物病毒分子生物学。E-mail: yonghoujiang@163.com。

EB 固体,购自 Boehringer Mannheim 公司;EvaGreen,购自 Biotum 公司;DNA Gel Extraction Kit,购自 Axygen 公司。主要仪器:Bio-Rad S1000PCR 扩增仪;Tanon 1600 凝胶成像分析系统;Nanodrop 2000 紫外分光光度计;Fresco 21 离心机;ABI 7300 荧光 PCR 仪。

1.2 试验方法

1.2.1 引物设计 从 GenBank 下载现有的 PRRSV 全基因组

表 1 用于标准质粒构建的 PRRSV 普通 PCR 和荧光定量 PCR 引物

引物序列 (5'→3')	产物大小 (bp)	碱基位置	参考序列
1-F:GAGTTTCAGCGGAACAATGG;1-R:GCCGTTGACCGTAGTGGAG	451	14 269 ~ 14 719	JX317648
2-F:ATGATAGCACAGCTCCACAGAA;2-R:CCGCGACTTACCTTTAGAGC	88	14 313 ~ 14 400	JX317648

1.2.2 PRRSV 重组质粒标准品制备

1.2.2.1 PRRSV 核酸提取及普通 PCR 扩增 根据 RNA 提取试剂盒要求进行病毒 RNA 提取。以提取的 RNA 为模板,按照反转录试剂盒说明将提取产物反转录成 cDNA;以获得的 cDNA 为模板进行 PCR 反应,在 0.2 mL PCR 管中依次加入 2.5 μL 10 × Buffer,2.0 μL 25 mmol/L MgCl₂,各 0.5 μL 上下游引物 1,0.5 μL 2.5 mmol/L dNTP,0.3 μL Taq DNA 聚合酶(5 U/μL),1.0 μL cDNA (约 100 ng),加入 ddH₂O 至总体积为 25.0 μL。反应程序:95 ℃ 3 min;94 ℃ 30 s,56 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,30 个循环;72 ℃ 10 min。反应结束后,使用 DL2000 Marker 对 PCR 产物的目的片段进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.2.2 标准品模板构建 根据 DNA Gel Extraction Kit 操作说明书进行产物割胶回收。回收产物参照 TaKaRa pMD 18-T Vector 试剂盒说明书连接到 pMD18-T 载体中。将重组质粒转化到感受态细胞 DH5α 内,通过氨苄青霉素(Amp⁺)培养基筛选,提取重组质粒进行 PCR 鉴定,并将电泳检测正确的重组质粒委托 Sangon 公司进行序列测定,将经测序验证后正确的重组质粒用紫外分光光度计 Nanodrop 2000 测定浓度,根据阿弗加德罗常数将浓度转换为拷贝数,再按 10 倍梯度进行系列稀释,制成 PRRSV 重组质粒标准品。

1.3 PRRSV EvaGreen 实时荧光定量 PCR 方法建立

EvaGreen 实时荧光 PCR 反应体系总体积为 10 μL,反应体系组成:1.2 μL 25 mmol/L Mg²⁺,1 μL 10 × Buffer,0.8 μL 2.5 mmol/L dNTP Mix,0.5 μL 20 × EvaGreen,0.5 U Taq 酶,各 0.2 μL 上下游引物 2,1 μL PRRSV 重组质粒标准品(模板),加灭菌 ddH₂O 补足体积至 10 μL。扩增完成后进行熔解曲线制作过程,扩增程序:95 ℃ 3 min;95 ℃ 15 s,60 ℃ 1 min,40 个循环。熔解曲线程序:95 ℃ 15 s,60 ℃ 1 min,95 ℃ 15 s,60 ℃ 开始收集荧光信号,制作熔解曲线。

1.4 PRRSV EvaGreen 实时荧光定量 PCR 方法评价

1.4.1 特异性试验 按照 EvaGreen 实时荧光 PCR 反应体系配制 7 份试剂,1 份加入 1 μL PRRSV 的 cDNA (约 100 ng) 作为模板,其余 6 份为对照组,模板中分别加入其他 5 种猪病毒,包括 CSFV、PCV2、PPV、PRV 和 JEV 的 DNA/cDNA 1 μL (约 100 ng),另 1 份加入 1 μL ddH₂O 为阴性对照,按实时荧光定量 PCR 反应程序扩增,验证其特异性。

1.4.2 灵敏度试验 将 PRRSV 标准品质粒进行 10 倍梯度系列浓度稀释,进行 EvaGreen 实时荧光定量 PCR 反应。通

序列,利用 DNASTar 软件进行序列比对后,结合文献报道,选出 PRRSV 的特异性保守区域,借助 Primer Premier 5.0 设计 1 对引物 1,对应扩增产物长度为 451 bp,用于构建重组质粒,并在此扩增产物序列范围内再设计 1 对用于 EvaGreen 实时荧光定量 PCR 的引物 2,对应扩增产物长度为 88 bp(表 1)。引物由 Sangon 公司合成。

过能够检测出阳性结果的最高稀释度的拷贝数,确定 PRRSV 在 EvaGreen 实时荧光定量 PCR 中的灵敏度。

1.4.3 重复性试验 选用同一次制备的 PRRSV 的 3 个浓度梯度(10⁴、10³、10² copies/μL)的质粒标准品分别进行批内、批间重复试验。批内重复试验是将每个浓度在同一次 EvaGreen 实时荧光中重复 3 次;批间重复试验是在 3 个不同时间段进行试验,对 3 个浓度梯度标准品进行 EvaGreen 实时荧光 PCR 反应。

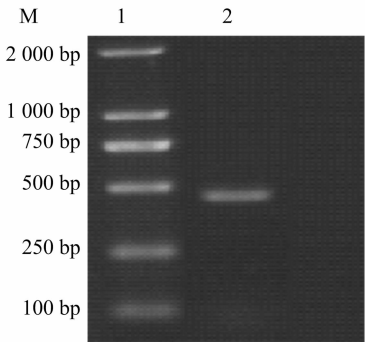
1.5 临床样品检测

对 118 份临床样品分别进行 EvaGreen 实时荧光定量 PCR、常规 PCR 检测,比较其检测结果。

2 结果与分析

2.1 重组质粒标准品的制备

PRRSV 疫苗经总 RNA 提取、反转录和 PCR 扩增,将产物克隆至 pMD18-T 载体;以获得的重组质粒为模板,用构建病毒标准品的引物(表 1)进行普通 PCR 扩增,经凝胶电泳检测分析得到条带大小为 451 bp,与预期目的片段大小相符(图 1)。对含 PRRSV 目的片段的重组质粒测序后,经 BLAST 在线比对分析,表明该克隆插入的 DNA 序列确实为 PRRSV 部分核酸序列,表明 PRRSV 重组质粒构建成功。



M—DL2000 marker; 1—PRRSV 扩增产物; 2—阴性对照
图 1 PRRSV 目的片段 PCR 扩增结果

2.2 PRRSV EvaGreen 实时荧光 PCR 特异性

应用构建好的 EvaGreen 实时荧光定量 PCR 反应体系,用 PRRSV 荧光引物 2(表 1)同时对 PRRSV 核酸、非靶病毒核酸(CSFV、PCV2、PPV、PRV、JEV)和 ddH₂O 进行实时荧光 PCR 扩增,发现 PRRSV 的引物 2 只能特异性扩增 PRRSV 核酸,呈现特异熔解峰,其熔解峰值对应 T_m 为 81.1 ℃,而对其

他非目标病毒及 ddH₂O 均不能扩增(图 2),表明建立的检测方法具有较好的特异性。

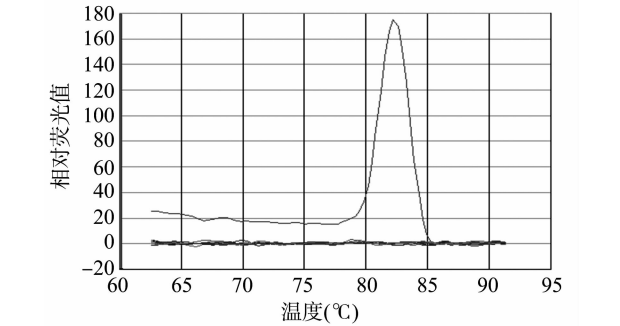
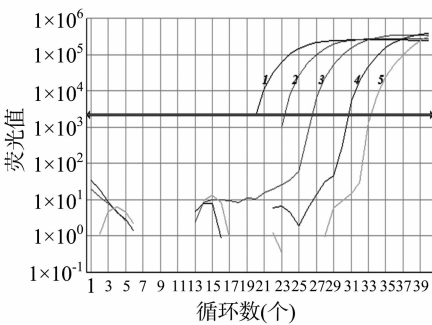
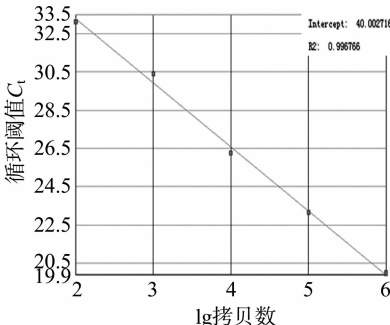


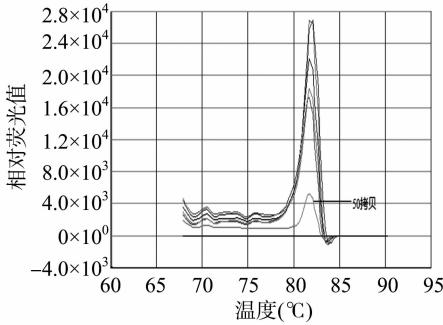
图2 PRRSV EvaGreen 实时荧光定量 PCR 特异性结果



A. PRRSV 的扩增曲线



B. PRRSV 的标准曲线



C. PRRSV 的灵敏度

1、2、3、4、5 分别表示 PRRSV 的标准品浓度为 10⁶、10⁵、10⁴、10³、10² copies/μL

图3 PRRSV 的 EvaGreen 实时荧光定量 PCR 扩增曲线、标准曲线及灵敏度

2.4 PRRSV EvaGreen 实时荧光定量 PCR 重复性

PRRSV 在 EvaGreen 实时荧光 PCR 中(10⁴、10³、10² copies/μL)3 个浓度循环阈值 C_t 重复性检测(表 2)。其批间重复变异系数分别为 0.40%、1.32%、1.68%,批内重复变异系数分别为 0.37%、0.93%、0.93%;2 种重复试验中的变异系数均小于 2%,表明重复性良好。

表 2 EvaGreen 实时荧光定量 PCR 检测 PRRSV 重复性

标准品浓度 (copies/μL)	批内重复		批间重复	
	变异系数 (%)	标准差 (copies/μL)	变异系数 (%)	标准差 (copies/μL)
10 ⁴	0.37	0.10	0.40	0.11
10 ³	0.93	0.28	1.32	0.39
10 ²	0.93	0.31	1.68	0.56

2.5 临床样品检测

应用本研究所建立的 PRRSV EvaGreen 实时荧光定量 PCR 方法、常规 PCR 方法同时对 118 份临床样品进行 PRRSV 检测,结果表明,用实时荧光定量 PCR 方法共检测出 37 份 PRRSV 阳性样品(20 份阳性血清样品、17 份阳性组织样品),阳性率为 31.4%,与普通 PCR 方法检测结果完全一致。

3 讨论与结论

自 2006 年,高致病性 PRRSV 在中国南方部分地区猪场暴发,并逐渐蔓延扩散到北方各地区,给养猪业带来了巨大的经济损失。猪繁殖与呼吸综合征潜伏期短,从感染到出现病症间隔大约为 3~37 d,不同年龄、品种的猪均可感染,具有传播速度快、发病率高、病死率高的特征,属于一旦发现必须向

2.3 PRRSV 实时荧光 PCR 标准曲线和检测灵敏度

将 PRRSV 重组质粒稀释成系列浓度标准品(10⁶、10⁵、10⁴、10³、10² copies/μL)进行实时荧光 PCR 反应,对实时荧光 PCR 反应条件进行优化,建立检测 PRRSV 的 PCR 标准曲线及相应扩增曲线(图 3),可以看出其中标准品浓度在 100~10⁶ copies/μL 内有良好线性关系,其中扩增效率为 98.7%(R²>0.99)。PRRSV 系列浓度梯度标准品在实时荧光 PCR 体系中,所能检测到的最高稀释度的标准品,即能够产生相应特异溶解峰的最低拷贝数模板即为相应灵敏度。PRRSV 标准品(50~10⁶ copies/μL)为模板时溶解曲线均有明显目的峰产生,25 copies/μL 时无目的峰,表明 PRRSV 重组质粒灵敏度可达 50 copies/μL。

世界动物卫生组织通报的烈性传染病。PRRSV 常与伪狂犬病病毒、猪圆环病毒 II 型、日本脑炎病毒、猪瘟病毒及猪细小病毒等病毒混合感染,在临床上常呈现出相似的病状,增加了临床诊断的难度。因此,建立一种能够快速、有效、准确地早期检测方法在 PRRS 的防控上具有重要意义。

本研究构建的 PRRSV EvaGreen 实时荧光定量 PCR 方法在特异性、重复性及灵敏度等方面都取得了比较理想的效果。本试验得到直线性较好的标准曲线,其扩增效率达到了 98.7%,说明 PRRSV 在 EvaGreen 实时荧光 PCR 中得到较好的扩增效果,而引物只能扩增相应的靶序列说明该方法具有较好的特异性。此外,EvaGreen 实时荧光定量 PCR 也呈现了较高的灵敏度。PRRSV 的检测极限可达到 50 copies/μL,较 Shin 等建立的 PRRSV 定量 PCR 方法检测极限 100 copies/μL^[16]的灵敏度要好。吴忆春建立的 PRRSV SYBR Green I 实时荧光 PCR 灵敏度达到 13 copies/μL^[17],稍高于本试验的灵敏度,但本研究所使用的 EvaGreen 是种新型荧光染料,其原理与 SYBR Green I 相同,实际操作中对 PCR 扩增的抑制作用更小,且不容易产生非特异性扩增^[18]。而较高浓度的 EvaGreen 亦能消除 SYBR Green I 溶解曲线中常见的“染料重分布”的缺陷,并具备更强的荧光信号及稳定性,尤其适于开发多重 PCR 检测技术^[15]。吴海港等建立的 TaqMan 探针荧光定量 PCR 检测 PRRSV 的灵敏度达到 5 copies/μL^[19],但 TaqMan 探针的成本较高,须要设计相应的探针,且容易受探针结合位点序列突变的影响导致假阴性结果^[20],而 EvaGreen 染料实时荧光 PCR 相对简单,只须设计目的引物,更适用于 PRRSV 的基础研究及流行病学调查。

在临床样品检测中,对118份临床样品(收集自湖北省等地猪场的共58份血清样品和杭州市内不同猪肉市场的共60份组织样品)进行PRRSV检测,其中用实时荧光定量PCR方法共检测出37份PRRSV阳性样品,阳性率为31.4%,与普通PCR方法检测结果符合率为100%。血清样品中PRRSV的阳性检出率为34.5%,稍高于组织样品中PRRSV的阳性检出率28.3%,检测结果与李蕾对2010年全国10个省1375份和2011年12个省1707份生猪屠宰场组织样品利用普通PCR进行检测得出的28.7%、16.75% PRRSV阳性率相类似^[21]。而韩庆安等采用逆转录PCR(RT-PCR)方法对河北不同地区收集的2159份商品猪的肺脏或肺门淋巴结进行PRRSV检测,结果表明,PRRSV样品阳性率为11.90%^[22];范仲鑫等用RT-PCR方法对采自湖南地区不同屠宰场的50份猪肺门淋巴结进行PRRSV的检测,结果表明,阳性率为16%^[23];刁有祥等应用PCR方法对125份临床健康猪肺脏进行PRRSV检测,结果表明有12份PRRSV阳性样品,阳性率为9.6%^[24],均低于本研究中的PRRSV检出率。以上结果表明,PRRSV在猪体内不同组织器官中分布不同,且不同地域的流行率也存在差异,可能由于样品收集横跨多个省(市、区),不同地区饲养模式及感染情况不同。这些结果还表明,PRRSV在我国猪群中相当流行,是养猪业健康发展的一大潜在危险,应当引起足够的重视,加强对PRRSV的防御和控制,规范养猪业和科学合理用药。

本研究采用新型饱和染料EvaGreen成功建立了PRRSV荧光定量PCR检测方法,具有快速、准确、简便等优点,为PRRSV早期诊断、流行病学调查及其防控措施研究提供了技术支持。

参考文献:

- [1] Zhao M, Ning Z, Wang H, et al. Sequence analysis of NSP9 gene of 25 PRRSV strains from Guangdong province, subtropical southern China[J]. *Virus Genes*, 2013, 46(1): 88-96.
- [2] Kvisgaard L K, Hjulsgaard C K, Brar M S, et al. Genetic dissection of complete genomes of Type 2 PRRS viruses isolated in Denmark over a period of 15 years[J]. *Veterinary Microbiology*, 2013, 167(3/4): 334-344.
- [3] Zhou Z, Li X, Liu Q, et al. Complete genome sequence of two novel Chinese virulent porcine reproductive and respiratory syndrome virus variants[J]. *Journal of Virology*, 2012, 86(11): 6373-6374.
- [4] Du Y, Lu Y, Qi J, et al. Complete genome sequence of a moderately pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus variant strain[J]. *Journal of Virology*, 2012, 86(24): 13883-13884.
- [5] 孙春亮, 赵敬慧, 刘月, 等. 区分高低致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒RT-PCR方法的建立[J]. *江苏农业科学*, 2015, 43(7): 226-228.
- [6] 岳晓娟. 猪繁殖与呼吸综合征病毒 Myanmar 株分离鉴定及全基因序列测定[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2012.
- [7] Zhang H Y, Liang J J, Meng X M, et al. Molecular epidemiology of PRRSV from China's Guangxi Province between 2007 and 2009[J]. *Virus Genes*, 2013, 46(1): 71-80.
- [8] 刘卫东. 猪繁殖与呼吸综合征的诊断与防控[J]. *中国畜牧兽医文摘*, 2013, 29(1): 132-133.
- [9] 代军, 雷蕾, 任志华. 猪繁殖与呼吸综合征防控研究进展[J]. *动物医学进展*, 2014, 35(4): 97-101.
- [10] 伊良, 甄春来, 唐守营. 高致病性猪蓝耳病的预防与控制[J]. *畜牧兽医科技信息*, 2009(1): 68.
- [11] 王建, 张维谊, 鞠厚斌, 等. 2004—2012年上海地区猪繁殖与呼吸综合征流行情况调查[J]. *中国预防兽医学报*, 2015, 37(3): 190-193.
- [12] Wilhelm J, Pingoud A. Real-time polymerase chain reaction[J]. *ChemBiochem*, 2003, 4(11): 1120-1128.
- [13] Kubista M, Andrade J M, Bengtsson M, et al. The real-time polymerase chain reaction[J]. *Molecular Aspects of Medicine*, 2006, 27(2/3): 95-125.
- [14] Arvidsson S, Kwasniewski M, Riaño-Pachón D M, et al. QuantPrime—a flexible tool for reliable high-throughput primer design for quantitative PCR[J]. *BMC Bioinformatics*, 2008, 9(1): 465.
- [15] Cheng J, Jiang Y, Rao P, et al. Development of a single-tube multiplex real-time PCR for detection and identification of five pathogenic targets by using melting-curve analysis with EvaGreen[J]. *Archives of Virology*, 2013, 158(2): 379-386.
- [16] Shin J, Bautista E M, Kang Y B, et al. Quantitation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus RNA in semen by single-tube reverse transcription-nested polymerase chain reaction[J]. *Journal of Virological Methods*, 1998, 72(1): 67-79.
- [17] 吴忆春. 猪繁殖与呼吸综合征病毒 SYBRGreen I 实时荧光定量PCR检测方法的建立[J]. *动物医学进展*, 2013, 34(2): 20-24.
- [18] Khan S A, Sung K, Nawaz M S. Detection of *aacA-aphD*, *qacEΔ1*, *marA*, *floR*, and *tetA* genes from multidrug-resistant bacteria: comparative analysis of real-time multiplex PCR assays using EvaGreen® and SYBR® Green I dyes[J]. *Molecular and Cellular Probes*, 2011, 25(2/3): 78-86.
- [19] 吴海港, 饶品彬, 蔡晔, 等. 快速实时荧光定量PCR检测猪繁殖与呼吸综合征病毒方法的建立[J]. *浙江理工大学学报(自然科学版)*, 2015, 33(2): 258-263.
- [20] Zheng L L, Wang Y B, Li M F, et al. Simultaneous detection of porcine parvovirus and porcine circovirus type 2 by duplex real-time PCR and amplicon melting curve analysis using SYBR Green[J]. *Journal of Virological Methods*, 2013, 187(1): 15-19.
- [21] 李蕾. 2010—2011年我国部分省区PRRS分离鉴定及分子流行病学调查[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2012.
- [22] 韩庆安, 翟刚, 李天艳, 等. 2007—2010年河北省猪蓝耳病病毒隐性感染情况调查[J]. *中国动物检疫*, 2011, 28(5): 61-63.
- [23] 范仲鑫, 刘道新, 何世成, 等. 湖南高致病性猪蓝耳病隐性感染情况调查[J]. *中国动物检疫*, 2008, 25(12): 34-36.
- [24] 刁有祥, 丁家波, 姜世金, 等. 猪传染性胸膜肺炎病料中PCV-2和PRRSV的PCR检测[J]. *微生物学报*, 2005, 45(3): 397-400.