

徐之恒, 孙少辉, 董友富, 等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒 2 型 TaqMan MGB 探针荧光定量 PCR 方法的建立 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (4): 84-88.

XU Z H, SUN S H, DONG Y F, et al. Establishment of a TaqMan MGB probe fluorescence quantitative PCR method for porcine reproductive and respiratory syndrome virus type 2 [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56 (4): 84-88.

## 猪繁殖与呼吸综合征病毒 2 型 TaqMan MGB 探针 荧光定量 PCR 方法的建立

徐之恒<sup>1#</sup>, 孙少辉<sup>2#</sup>, 董友富<sup>3</sup>, 唐伟明<sup>3</sup>, 徐孝宙<sup>4</sup>, 邢军<sup>4</sup>,  
李豪<sup>3</sup>, 孙刘妹<sup>3</sup>, 万进<sup>2</sup>, 王聪<sup>2\*</sup>, 张振东<sup>3\*</sup>

(1. 扬州大学医学院 (转化医学研究院), 江苏 扬州 215001;

2. 中牧实业股份有限公司, 北京 100070;

3. 江苏科技大学生物技术学院, 江苏 镇江 212018;

4. 江苏农林职业技术学院, 江苏 句容 212400)

**摘要:** 为了准确、特异、高效地检测猪繁殖与呼吸综合征病毒 2 型 (PRRSV2), 本研究根据 GenBank 上登录的 PRRSV2 不同谱系流行毒株的 ORF6 基因序列, 选取保守区域设计合成了 1 对特异性检测引物和 1 条 MGB 探针, 经优化退火温度、引物和探针比例等反应条件及敏感性、特异性、重复性试验, 建立了检测 PRRSV2 的 TaqMan MGB 荧光定量 PCR 方法。结果: 以猪繁殖与呼吸综合征病毒 1 型 (PRRSV1)、伪狂犬病病毒 (PRV)、猪瘟病毒 (CSFV)、猪圆环病毒 2 型 (PCV2)、猪圆环病毒 3 型 (PCV3)、猪流行性腹泻病毒 (PEDV) 及猪细小病毒 (PPV) 等阳性核酸为模板, 均无扩增; 对标准质粒的最低检测下限为  $1 \times 10^1$  copies/ $\mu$ L, 建立的标准曲线呈现良好的线性关系, 相关系数  $R^2$  为 0.994; 稳定性和重复性好, 批内和批间变异系数均小于 1.78%。应用该方法对保留的 30 份临床阳性样品进行检测, 结果阳性 100%, Ct 值在 22~36 间。综上, 本研究建立的 TaqMan MGB 荧光定量 PCR 方法可用于临床和实验室中 PRRSV2 的快速检测, 为猪繁殖与呼吸综合征的防控提供了技术支持。

**关键词:** 猪繁殖与呼吸综合征病毒; ORF6 基因; TaqMan MGB; qPCR

中图分类号: S852.65

文献标志码: A

文章编号: 0529-5130(2024)04-0084-05

## Establishment of a TaqMan MGB probe fluorescence quantitative PCR method for porcine reproductive and respiratory syndrome virus type 2

XU Zhiheng<sup>1#</sup>, SUN Shaohui<sup>2#</sup>, DONG Youfu<sup>3</sup>, TANG Weiming<sup>3</sup>, XU Xiaozhou<sup>4</sup>, XING Jun<sup>4</sup>,  
LI Hao<sup>3</sup>, SUN Liumei<sup>3</sup>, WAN Jin<sup>2</sup>, WANG Cong<sup>2\*</sup>, ZHANG Zhendong<sup>3\*</sup>

(1. College of Medicine (Institute of Translational Medicine) Yangzhou University, Yangzhou 225001, China;

2. China Animal Husbandry Industry Co., Ltd., Beijing 100070, China;

3. College of Biotechnology, Jiangsu University of Science and Technology, Zhenjiang 212018, China;

4. Jiangsu Vocational College of Agriculture and Forestry, Jurong 212400, China)

**Abstract:** In order to establish an accurate, specific, efficient and rapid fluorescence quantitative PCR method for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus type 2 (PRRSV2), a pair of specific primers and a MGB probe were designed and synthesized according to the ORF6 gene of different lineage PRRSV2 strains registered in GenBank. Then, a TaqMan MGB fluorescence quantitative PCR method for the detection of PRRSV2 was established by optimizing the conditions and systems of reaction, primer and probe ratio, and by conducting sensitivity, specificity and reproducibility experiments. The results showed that the method was highly specific and did not amplify the nucleic acid of PRRSV1, classical swine fever virus (CSFV), porcine pseudorabies virus (PRV), porcine circovirus type 2 (PCV2),

收稿日期: 2023-04-11; 修回日期: 2024-01-25

基金项目: 江苏省基础研究计划 (自然科学基金) 青年基金项目 (BK20201005); 江苏农林职业技术学院校企合作项目 (2020kj021)

第一作者: 徐之恒, 男, 本科生; 孙少辉, 男, 硕士, 兽医师。<sup>#</sup>为共同第一作者

\* 通信作者: 王聪, 博士, 主要从事动物疫病诊断及防控方面的研究, E-mail: wangcong198895@163.com; 张振东, 副教授, 主要从事动物分子病毒学方面的研究, E-mail: zhendongzhang@just.edu.cn。

porcine circovirus type 3 (PCV3), porcine epidemic diarrhea virus (PEDV), porcine parvovirus (PPV) and other pathogens. The minimum detection limit of the standard plasmid was  $1 \times 10^1$  copies/ $\mu\text{L}$ . The standard curve showed a good linear relation, and the correlation coefficient was ( $R^2=0.994$ ), with good stability and reproducibility. The intra- and inter-assay coefficients of variation were less than 1.78%. 30 clinical positive samples were also positive using this method with Ct values between 22 and 36. In summary, the PRRSV2 TaqMan MGB fluorescence quantitative PCR method established in this study could be used for rapid detection of PRRSV2 in clinical practice and laboratory trial, providing technical support for PRRS control.

**Keywords:** porcine reproductive and respiratory syndrome virus; ORF6 gene; TaqMan MGB; qPCR

猪繁殖与呼吸综合征 (PRRS) 是由猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) 引起的一种以母猪的繁殖障碍、生长猪的呼吸道疾病以及感染猪的继发感染为主要临床表现的重要疫病, 给我国生猪产业带来了巨大的经济损失<sup>[1-2]</sup>。PRRSV 分为 PRRSV1 (欧洲型) 与 PRRSV2 (美洲型) 两个种, 我国主要以 PRRSV2 的流行为主<sup>[3]</sup>。根据 ORF5 基因序列, PRRSV2 共分为 9 个谱系, 我国主要流行 4 个谱系 (谱系 1、3、5、8)<sup>[4]</sup>。2006 年我国暴发高致病性 PRRSV (HP-PRRSV), 其 *nsp2* 基因存在 30 个氨基酸的缺失 (1+29)<sup>[5]</sup>; 2013 年类 NADC30 毒株传入我国, 其 *nsp2* 基因存在 131 个氨基酸的缺失 (111+1+19)<sup>[6]</sup>; 2017 年开始, 类 NADC34 毒株在我国多个省份被检出, 其 *nsp2* 基因的缺失特征为连续的 100 个氨基酸<sup>[7]</sup>。近年来, 疫苗演化毒株、谱系 1 的类 NADC30/NADC34 毒株及不同谱系之间的重组毒株频繁检出<sup>[8-9]</sup>, 使得 PRRSV 田间流行毒株呈现出明显的多样性和复杂性, 严重困扰着我国猪场的生产发展, 尤其在生物安全防控较差的猪场, PRRS 时有暴发流行。为做好 PRRS 的预警、防控及净化工作, 临床生产中往往通过对新生仔猪睾丸处理液、家猪口水液、临断奶弱仔猪血液等样本的检测, 及时了解猪群 PRRSV 的感染状态, 进而适时采取不同的控制措施。因此, 建立一种特异性强、灵敏度高、操作简单的检测方法对 PRRS 的筛查、诊断、防控及净化工作意义重大<sup>[10]</sup>。本研究根据国内 PRRSV2 不同谱系流行毒株的情况, 选取 ORF6 基因保守区域设计合成了 1 对引物和 1 条 MGB 探针, 建立了一种通用型的 TaqMan MGB 荧光定量 PCR (RT-qPCR) 检测方法, 以期为临床上 PRRS 的快速诊断及科学防控提供技术支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 病毒核酸与临床样品

猪瘟病毒 (CSFV)、PRRSV (欧洲型与美洲型)、猪伪狂犬病毒 (PRV)、猪圆环病毒 2 型 (PCV2)、猪圆环病毒 3 型 (PCV3)、猪细小病毒 (PPV) 和猪流行性腹泻病毒 (PEDV) 的核酸样本均由本实验室保存; 30 份 PRRSV 阳性病料 (RT-

PCR 初检阳性) 来自江苏省不同地区规模化猪场。

### 1.2 主要试剂

Bio Flux Simply P 病毒 DNA/RNA 提取试剂盒购自杭州博日科技股份有限公司; PrimeScript RT reagent Kit 购自宝生物工程 (大连) 有限公司; 2 $\times$ Es Taq MasterMix (Dye) 反应酶购自江苏康为世纪生物科技股份有限公司; DL2000 Plus DNA Marker、Fast-Pure Plasmid Mini Kit 及 AceQ<sup>®</sup> qPCR Probe Master Mix 均购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; pMD19-T 载体购自宝生物工程 (大连) 有限公司。

### 1.3 主要仪器

PCR 扩增仪, 购自美国 Applied Biosystems 公司; CFX96 Touch 实时荧光定量 PCR 仪, 购自美国 Bio-Rad 公司; 琼脂糖凝胶电泳仪, 购自北京六一仪器厂; 凝胶成像分析系统, 购自南京麦高德生物科技有限公司。

### 1.4 引物与探针的设计合成

选取 PRRSV2 不同谱系常见参考毒株 ORF6 基因的保守区域, 设计并合成荧光定量 PCR 方法的上下游引物及探针序列。PRRSV2-F: 5'-TTGCTAGGC-CGCAAGTACAT-3'; PRRSV2-R: 5'-GGACGACAAATGCGTGTTA-3'; PRRSV2-P: 5' FAM-TCT-GGCCCCCTGCCCA-MGB-3'。引物和探针由浙江尚亚生物技术有限公司合成。

### 1.5 标准阳性质粒的制备

以 PRRSV2 阳性样品的 cDNA 作为模板, 使用上述引物进行 PCR 扩增。将 PCR 产物凝胶回收并纯化后克隆至 pMD19-T 载体, 送至浙江尚亚生物技术有限公司测序鉴定, 测序成功的阳性质粒命名为 p19T-PRRSV2-M。使用微量紫外分光光度计测定阳性质粒浓度, 并计算质粒拷贝数。质粒拷贝数 = 质粒浓度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )  $\times 6.02 \times 10^{23}$  (copies/mol) / 质粒碱基数  $\times 660$  (g/mol)。随后按照泊松分布的原理进行 10 倍比稀释质粒标准品, 稀释至  $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^1$  copies/ $\mu\text{L}$ , 每次稀释样品时, 涡旋仪震荡 30 s, 移液枪吹打 50 次, 重复 3 次, 使质粒充分溶解于 ddH<sub>2</sub>O 中, 做好标记, 保存于 -20 °C 冰箱备用。

## 1.6 RT-qPCR 反应体系、反应条件的优化及标准曲线的建立

采用 20  $\mu\text{L}$  反应体系,  $2 \times \text{AceQ qPCR Probe Master Mix}$  10  $\mu\text{L}$ , 探针 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 0.3  $\mu\text{L}$ , 上下游引物 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 分别设置 3 个体积, 即 0.4、0.6、0.8  $\mu\text{L}$  以优化反应体系, 模板 1  $\mu\text{L}$ ,  $\text{ddH}_2\text{O}$  补齐至 20  $\mu\text{L}$ 。反应条件为: 预变性 95  $^\circ\text{C}$  5 min; 变性 95  $^\circ\text{C}$  10 s, 分别设置 56  $^\circ\text{C}$ 、58  $^\circ\text{C}$  和 60  $^\circ\text{C}$  以优化反应的退火温度, 退火时间 31 s, 循环数 40 个。将标准质粒 10 倍倍比稀释后, 按照已优化的方法进行扩增, 每个梯度设置 3 个重复, 以  $C_t$  值为  $Y$  轴, 标准品拷贝指数为  $X$  轴, 由荧光定量 PCR 仪自动生成标准曲线。

## 1.7 特异性试验

用本实验室保存的 PRRSV、CSFV、PRV、PCV2、PCV3、PEDV、PPV 的核酸样本为模板, 进行 RT-qPCR 反应, 验证该方法的特异性。

## 1.8 重复性试验

用  $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^4$  copies/ $\mu\text{L}$  的阳性标准质粒进行 RT-qPCR, 每个梯度设置 3 个重复, 根据检测所得  $C_t$  值计算组内标准差和变异系数; 在不同时间段 (间隔 1 周) 对不同稀释度 ( $10^7$ 、 $10^6$ 、 $10^5$ 、 $10^4$  copies/ $\mu\text{L}$ ) 的标准质粒进行 3 次检测, 根据所得  $C_t$  值计算组间标准差和变异系数 ( $CV$ )。

## 1.9 临床样品的检测

取本实验室从江苏省部分猪场收集的 30 份 PRRSV 阳性病料, 利用 Bio Flux Simply P 病毒 DNA/RNA 提取试剂盒提取 PRRSV RNA, 反转录 cDNA 为模板, 按照本研究建立的方法进行 RT-qPCR 扩增, 以验证本研究建立方法的有效性。

## 2 结果

### 2.1 标准质粒的制备

使用本研究设计的上下游引物扩增出目的片段 (图略), 将其克隆至 pMD19-T 载体上, 测序后与所选区域的基因序列完全一致。测定阳性质粒浓度为 203.64 ng/ $\mu\text{L}$ , 根据拷贝数计算公式得出阳性质粒原始拷贝数为  $4.74 \times 10^{10}$  copies/ $\mu\text{L}$ , 先将阳性质粒稀释至  $1 \times 10^{10}$  copies/ $\mu\text{L}$ , 再按照泊松分布的原理对其进行 10 倍倍比稀释, 取  $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^1$  copies/ $\mu\text{L}$  阳性质粒进行 RT-qPCR 检测。

### 2.2 反应体系和条件的确定

经过退火温度和引物探针配比的优化, 最终确定了 PRRSV2 TaqMan MGB 实时荧光 PCR 扩增反应体系:  $2 \times \text{AceQ qPCR Probe Master Mix}$  10  $\mu\text{L}$ , 探针 (10

$\mu\text{mol/L}$ ) 0.3  $\mu\text{L}$ , 上下游引物 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 各 0.4  $\mu\text{L}$ , 模板 1  $\mu\text{L}$ ,  $\text{ddH}_2\text{O}$  补充至 20  $\mu\text{L}$ 。扩增条件: 95  $^\circ\text{C}$  预变性 5 min; 95  $^\circ\text{C}$  10 s, 60  $^\circ\text{C}$  31 s, 采集 FAM 通道荧光, 共进行 40 个循环。

### 2.3 标准曲线的建立

使用拷贝数为  $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^1$  copies/ $\mu\text{L}$  的标准品进行 RT-qPCR, 每组 3 个重复, 设置 1 组阴性对照 (模板为  $\text{ddH}_2\text{O}$ )。结果显示, 该基因的扩增曲线均呈现较为典型的 S 型 (图 1), 不同稀释度下的扩增曲线间距均匀, 阴性对照无扩增。以起始模板拷贝数的对数为  $X$  轴,  $C_t$  值为  $Y$  轴, 绘制标准曲线, 可见不同稀释度下呈现出良好的线性关系 (图 2)。以不同稀释度下的  $C_t$  值 (表 1) 绘制标准曲线回归方程:  $y = -3.563x + 41.659$ ,  $R^2 = 0.994$ , 最低检测下限为 10 copies/ $\mu\text{L}$ 。

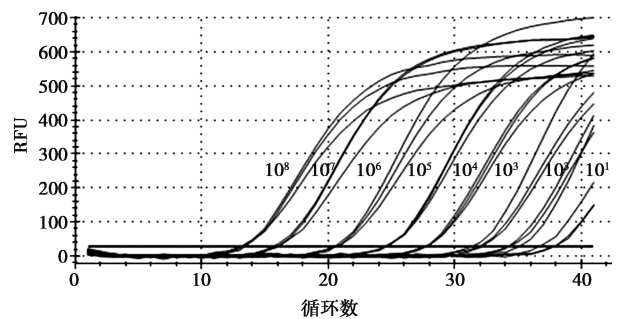


图 1 PRRSV2 ORF6 基因 TaqMan MGB RT-qPCR 扩增曲线

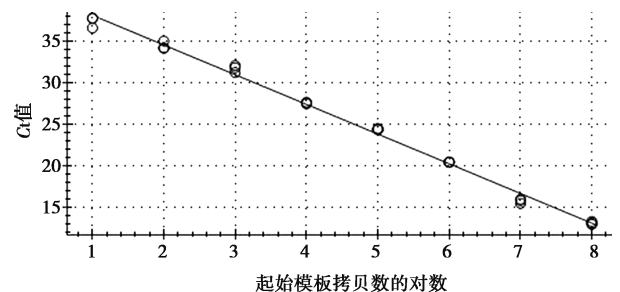


图 2 PRRSV2 ORF6 基因 TaqMan MGB RT-qPCR 标准曲线

### 2.4 特异性试验

使用本研究建立的 PRRSV2 ORF6 基因 TaqMan MGB RT-qPCR 方法对 PRRSV1、PRRSV2、CSFV、PRV、PCV2、PCV3、PEDV、PPV 的核酸及阴性对照 ( $\text{ddH}_2\text{O}$ ) 进行扩增, 结果如图 3 所示, 只有 PRRSV 检测为阳性, 其他核酸和阴性对照均为阴性, 表明本研究建立的方法具有良好的特异性。

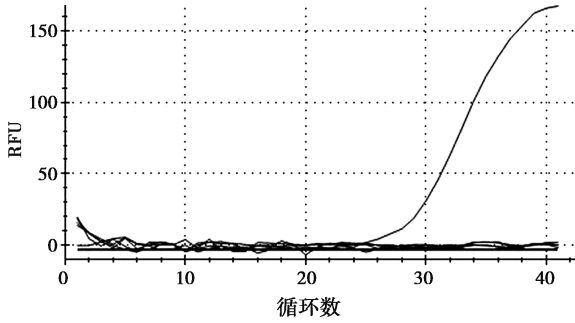


图3 PRRSV2 ORF6 基因 TaqMan MGB RT-qPCR 方法的特异性检测结果

### 2.5 重复性试验

将 p19T-PRRSV2-M 质粒原液稀释至  $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^4$  copies/ $\mu\text{L}$  进行批内与批间重复性试验。结果显示批内变异系数分别为 1.55%、0.16%、0.34% 和 0.31% (表 1); 批间变异系数分别为 1.68%、1.32%、1.28% 和 1.07% (表 2)。

### 2.6 PRRSV 临床阳性样品的检测

使用本研究建立的方法对 30 份 PRRSV 阳性样品进行检测, 结果显示, 30 份阳性样品均具有明显的扩增曲线, 阳性率 100%, Ct 值区间范围在 22~36 (图 4), 表明本试验所建立的方法可用于临床样品的检测。

表 1 荧光定量 PCR 批内重复性试验

质粒浓度/ (copies · $\mu\text{L}^{-1}$ )	Ct 值			平均值	标准差	CV/%
	1	2	3			
$10^7$	15.54	15.87	16.02	15.81	0.25	1.55
$10^6$	20.47	20.46	20.52	20.48	0.03	0.16
$10^5$	24.53	24.37	24.41	24.44	0.08	0.34
$10^4$	27.50	27.59	27.67	27.59	0.09	0.31

表 2 荧光定量 PCR 批间重复性试验结果

质粒浓度/ (copies · $\mu\text{L}^{-1}$ )	第 1 次		第 2 次		第 3 次		平均 CV/%
	Ct 值	CV/%	Ct 值	CV/%	Ct 值	CV/%	
$10^7$	15.81±0.28	1.77	16.07±0.26	1.62	16.85±0.28	1.66	1.68
$10^6$	19.94±0.15	0.75	20.05±0.30	1.50	19.29±0.33	1.71	1.32
$10^5$	23.91±0.31	1.30	24.12±0.35	1.45	23.85±0.26	1.09	1.28
$10^4$	27.01±0.23	0.85	27.35±0.35	1.28	27.12±0.29	1.07	1.07

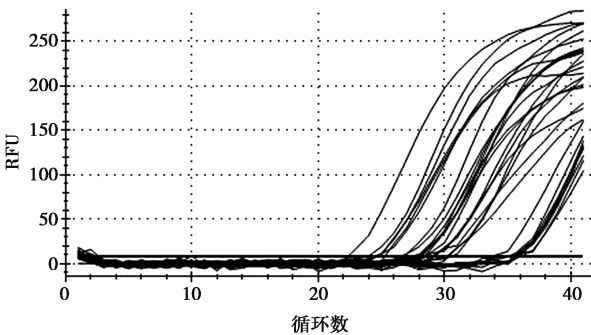


图 4 临床阳性样品的 RT-qPCR 检测结果

## 3 讨论

目前 PRRS 的防控依然是我国养猪业面临的最重大问题之一。不管是后备猪的更新入群, 还是仔猪的保健免疫, 通过实验室手段进行早期 PRRSV 的评估

筛查, 及时发现隐性带毒猪, 对 PRRS 的防控具有非常重要的意义<sup>[11-12]</sup>。2017 年, 农业农村部对全国核心育种场提出了 PRRS 的净化要求和标准, 即连续 24 个月以上无 PRRS 临床病例, 且野毒感染病原学和抗体阴性, 所以 PRRS 的净化工作更是离不开实验室检测。匈牙利通过实验室连续检测, 结合灭活苗免疫及后备猪更新的方式实现了 PRRS 的净化<sup>[13]</sup>。2018 年非洲猪瘟传入我国, 为做好病原的早期筛查及精准剔除, RT-qPCR 检测方法被广泛应用<sup>[14]</sup>, 极大地推动了我国动物疫病检测领域的发展, 这也更有利于我国 PRRS 等疫病的防控与净化工作。

PRRSV 是一种单股正链 RNA 病毒, 全长约 15 kb, 具有快速变异与演化的特性<sup>[3-4]</sup>。近年来, 我国 PRRSV2 的流行毒株发生变化, 且多样性和复杂性明显增多<sup>[15]</sup>, 因此, 建立一种特异性强、敏感度高的通用型检测方法对当前 PRRS 的诊断监控非常重

要。PRRSV 至少含有 10 个开放阅读框, 编码多种非结构蛋白和结构蛋白<sup>[16]</sup>, 本研究通过大量比对 GenBank 上登录的 PRRSV2 不同谱系毒株的片段序列, 发现编码主要结构蛋白 M 的 ORF6 基因上存在一段高度保守序列, 设计了特异性扩增 PRRSV2 不同谱系毒株 ORF6 基因的引物对和探针。TaqMan-MGB 探针是在经典 TaqMan 方法上经改良后发展而来的一种水解型探针, 特异性大大增强, 目前多种动物病原的 RT-qPCR 检测方法对 TaqMan-MGB 探针进行了更新与优化, 且表现出了非常好的应用效果<sup>[17-19]</sup>。本研究通过优化反应条件和反应体系, 在进行敏感性、特异性、重复性试验后, 建立了检测 PRRSV2 ORF6 基因的 TaqMan MGB 探针 RT-qPCR 方法, 该方法对 CSFV、PRV、PCV2 等常见的病原均无交叉反应, 对不同滴度的阳性标准质粒模板均具有典型的扩增曲线, Ct 值与浓度之间呈现良好的线性关系, 最低检出浓度为 10 copies/ $\mu\text{L}$ , 相比于已报道的普通 PCR 方法, 敏感性显著提高且检测时间大大缩短<sup>[20-21]</sup>。重复性试验显示组间与组内的离散度小, 表明该方法具有良好的重复性。对 30 份 PRRSV 阳性样品 (血样、唾液样、组织样、睾丸处理液等) 进行检测, 结果均为阳性, 但与初检 Ct 值存在 0.5~1.2 的差异, 这可能与样品长期存放的核酸降解有关。

综上, 本研究所建立的 TaqMan MGB 探针 RT-qPCR 方法是一种特异、灵敏、高效且可应用于临床上不同种类样品的检测方法, 为 PRRSV2 感染的快速诊断及防控净化提供了技术手段。

## 参考文献:

- [1] ZHANG Z D, LI Z, LI H, et al. The economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome outbreak in four Chinese farms: based on cost and revenue analysis [J]. *Front Vet Sci*, 2022, 9: 1024720.
- [2] ZHANG Z D, QU X Y, WANG X Q, et al. Production performance of four pig herds infected with porcine reproductive and respiratory syndrome using the "Load-Close-Exposure" approach in China [J]. *Front Vet Sci*, 2022, 9: 882971.
- [3] 杨汉春, 周磊. 猪繁殖与呼吸综合征病毒的遗传变异与演化 [J]. *生命科学*, 2016, 28 (3): 325-336.
- [4] 张振东, 曲向阳, 徐孝宙, 等. 基因 2 型猪繁殖与呼吸综合征病毒的遗传变异与演化 [J]. *畜牧与兽医*, 2021, 53 (4): 139-143.
- [5] TIAN K G, YU X L, ZHAO T Z, et al. Emergence of fatal PRRSV variants: unparalleled outbreaks of atypical PRRS in China and molecular dissection of the unique hallmark [J]. *PLoS One*, 2007, 2 (6): e526.
- [6] ZHOU L, WANG Z C, DING Y P, et al. NADC30-like strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, China [J]. *Emerg Infect Dis*, 2015, 21 (12): 2256-2257.
- [7] ZHANG H L, ZHANG W L, XIANG L R, et al. Emergence of novel porcine reproductive and respiratory syndrome viruses (ORF5 RFLP 1-7-4 viruses) in China [J]. *Vet Microbiol*, 2018, 222: 105-108.
- [8] ZHANG Z D, ZHOU L, GE X N, et al. Evolutionary analysis of six isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus from a single pig farm: MLV-evolved and recombinant viruses [J]. *Infect Genet Evol*, 2018, 66: 111-119.
- [9] ZHANG Z D, QU X Y, ZHANG H L, et al. Evolutionary and recombination analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome isolates in China [J]. *Virus Genes*, 2020, 56 (3): 354-60.
- [10] 张振东, 王聪, 王小泉, 等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒基因测序的临床应用 [J]. *动物医学进展*, 2022, 43 (9): 110-113.
- [11] SILVA G S, SCHWARTZ M, MORRISON R B, et al. Monitoring breeding herd production data to detect PRRSV outbreaks [J]. *Prev Vet Med*, 2017, 148: 89-93.
- [12] ROWLAND R R R, LUNNEY J K. Alternative strategies for the control and elimination of PRRS [J]. *Vet Microbiol*, 2017, 209: 1-4.
- [13] NEMES I, MOLNÁR T, ABONYI T, et al. Eradication of PRRS from backyard swine herds in Hungary between 2012 and 2018 [J]. *Acta Vet Hung*, 2019, 67 (4): 543-552.
- [14] 李静, 张蕾, 董春娜, 等. 我国非洲猪瘟病毒检测技术专利分析 [J]. *病毒学报*, 2023 (1): 222-230.
- [15] CUI X Y, XIA D S, HUANG X Y, et al. Analysis of recombinant characteristics based on 949 PRRSV-2 genomic sequences obtained from 1991 to 2021 shows that viral multiplication ability contributes to dominant recombination [J]. *Microbiol Spectr*, 2022, 10 (5): e0293422.
- [16] LIU Y Y, HU Y H, CHAI Y, et al. Identification of nonstructural protein 8 as the N-terminus of the RNA-dependent RNA polymerase of porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. *Virology*, 2018, 51 (5): 429-439.
- [17] 王盛, 万丽军, 谢芝勋, 等. 禽呼肠孤病毒 TaqMan MGB 探针实时荧光定量 PCR 快速检测方法的建立 [J]. *中国兽医学报*, 2022, 52 (11): 1385-1390.
- [18] 王淑娟, 班付国, 王东方, 等. 鉴别非洲猪瘟病毒和猪瘟疫病毒毒株二重 TaqMan MGB 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立及初步应用 [J]. *畜牧兽医学报*, 2021, 52 (1): 177-184.
- [19] 赵雪丽, 闫若潜, 王华俊, 等. 鉴别猪圆环病毒 2 型和 3 型双重 TaqMan MGB 探针 FQ-PCR 检测方法研究 [J]. *中国动物传染病学报*, 2022: 1-11. DOI: 10.19958/j.cnki.cn31-2031/s.20220303.003.
- [20] 高佳亮, 腾召剑, 陈立功, 等. 鉴别 PRRSV 经典、高致病性和类 NADC30 毒株 PCR 方法的建立及初步应用 [J]. *中国兽医学报*, 2021, 41 (3): 445-450.
- [21] 徐雷, 赵军, 杨晓宇, 等. 猪繁殖与呼吸综合征类 NADC30 与 HP-PRRSV 毒株 RT-PCR 鉴别方法的建立与应用 [J]. *江苏农业学报*, 2019, 35 (1): 109-113.