



# 猪萨佩罗病毒聚合酶链式反应检测方法的建立及应用

张 伟, 韩寅卓, 姜永厚

(浙江理工大学生命科学与医药学院, 杭州 310018)

**摘要:** 猪萨佩罗病毒(Porcine sapelovirus, PSV)是引发猪腹泻的重要病毒之一。为开发一种能快速、准确检测 PSV 的聚合酶链式反应检测方法, 针对 PSV 的保守区 3D 基因设计了一对特异性引物, 优化了聚合酶链式反应退火温度, 分析聚合酶链式反应检测方法特异性和灵敏度, 并应用于猪场样品检测。结果表明: 建立的聚合酶链式反应检测方法可特异性扩增出 PSV 目的片段, 对其他非靶标猪腹泻病毒则无条带产生, 检测下限为 5 拷贝/ $\mu$ L; 在浙江地区采集的 88 个健康猪粪便样本中检测 PSV 阳性率为 7.95%。该 PSV 聚合酶链式反应检测方法特异性强、灵敏度高, 可应用于 PSV 前期诊断和防控。

**关键词:** 猪萨佩罗病毒; 3D 基因; 聚合酶链式反应; 特异性; 灵敏度; 阳性率

**中图分类号:** TS195.644

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1673-3851(2024)09-0718-07

**引文格式:** 张伟, 韩寅卓, 姜永厚. 猪萨佩罗病毒聚合酶链式反应检测方法的建立及应用[J]. 浙江理工大学学报(自然科学), 2024, 51(5): 718-724.

**Reference Format:** ZHANG Wei, HAN Yinzhao, JIANG Yonghou. Establishment and application of a polymerase chain reaction detection method for porcine sapelovirus[J]. Journal of Zhejiang Sci-Tech University, 2024, 51(5): 718-724.

## Establishment and application of a polymerase chain reaction detection method for porcine sapelovirus

ZHANG Wei, HAN Yinzhao, JIANG Yonghou

(College of Life Sciences and Medicine, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

**Abstract:** Porcine sapelovirus (PSV) is one of the main viruses that cause diarrhea in pig herds. To establish a fast and accurate polymerase chain reaction (PCR) detection method for PSV, specific primers were designed targeting the 3D conserved region sequence of PSV, and the PCR annealing temperature was optimized. The specificity and sensitivity of the established PCR detection method were analyzed and applied to field samples on pig farms. According to the results, the established PCR detection method could specifically amplify the PSV target virus, while it produced no bands for other non-target pig diarrhea viruses, and the lower detection limit was 5 copies/ $\mu$ L. The positive rate of PSV was 7.95% in 88 healthy pig fecal samples collected in Zhejiang province. This PSV PCR detection method demonstrates excellent specificity and sensitivity, and can be applied in the early diagnosis and prevention of PSV.

**Key words:** porcine sapelovirus; 3D gene; polymerase chain reaction; specificity; sensitivity; positive rate

## 0 引言

猪萨佩罗病毒(Porcine sapelovirus, PSV)是一

种微球颗粒小 RNA 病毒, 为萨佩罗病毒属(Sapelovirus)成员<sup>[1-2]</sup>。因为 PSV 最早是从腹泻猪的肠道中分离出来, 被称作猪肠道病毒 8 型

(Porcine enterovirus 8, PEV8)<sup>[1,3]</sup>。PSV 基因组全长 7~8 kb,由 5'非编码区、一个大的开放阅读框、3'非编码区组成<sup>[2]</sup>。开放阅读框主要编码 12 个成熟的大蛋白<sup>[2-3]</sup>,包括 1 个先导蛋白(L)、4 个结构蛋白(VP1-4)和 7 个非结构蛋白(2A、2B、2C、3A、3B、3C 和 3D)。PSV 的宿主仅为猪,不同年龄的猪都可感染该病毒<sup>[3-4]</sup>,新生仔猪的免疫系统尚未发育完全,更容易感染 PSV<sup>[1,3]</sup>。猪感染 PSV 后可能会引起腹泻、肺炎和生殖系统障碍等症状,也可能伴随着无明显特征的亚临床症状。自 1960 年英国最早报道 PSV 以来,全球多个地区和国家都有 PSV 检出报道<sup>[5-9]</sup>,并且 PSV 常与猪捷申病毒(Porcine teschovirus, PTV)、猪圆环病毒(Porcine circovirus, PCV)和猪环曲病毒(Porcine torovirus, PToV)等病原混合感染,以致患病猪的临床症状更加复杂,也增大了分类诊断和防控难度<sup>[10]</sup>。因此,建立一种简便、精准、高效的诊断方法,是预防和控制 PSV 的主要措施。

PSV 诊断方法主要有病毒分离鉴定、免疫荧光法、酶联免疫吸附法、环介导等温扩增技术、聚合酶链式反应扩增技术<sup>[11-14]</sup>。由于病毒纯化难度大、实验周期长、成本高和传代培养成功率较低,所以病毒分离鉴定不适合用于大规模临床样本诊断检测<sup>[15]</sup>。免疫荧光法的检测结果可能会受到样品的采集时间、储存和转运等因素的影响,并且该方法存在非特异性染色和耗时长等缺点<sup>[16]</sup>。酶联免疫吸附法是一种经典的检测方法,但也存在交叉反应污染和耗材昂贵等缺点<sup>[17]</sup>。环介导等温扩增技术需要高特异性引物,且实验过程中极易产生气溶胶污染实验环境,从而导致发生假阳性结果,也不适用于大批量样品检测。目前检测猪腹泻病毒最常用的手段是聚合酶链式反应技术,聚合酶链式反应技术主要分为常规聚合酶链式反应和实时荧光定量聚合酶链式反应。与实时荧光定量聚合酶链式反应比较,常规聚合酶链式反应不需要价格高昂的耗材和仪器,可通过琼脂糖凝胶电泳显示结果,更加简便快速低廉<sup>[18-19]</sup>。关于 PSV 的常规聚合酶链式反应检测方法已有报道<sup>[6,18,20]</sup>,但检测的灵敏度并不高。

本文针对 PSV 的保守区 3D 基因设计特异性引物,探索建立一种特异性好、灵敏性强的常规聚合酶链式反应检测方法,为 PSV 初期控制和临床检测提供新的技术方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 模板与样品来源

PSV、PEDV、PTV、PCV2、PToV、PBoV、TGEV、PAstV、RVA 病毒和含目的片段的 PSV 质粒由本实验室保存,88 个健康猪粪便样本源于浙江省部分地区的猪场,样品均保存于 -80 °C 超低温冰箱。

### 1.2 主要仪器及试剂

紫外分光仪 Nanodrop 2000、-80 °C 超低温冰箱和聚合酶链式反应仪器(美国 Thermo 公司)、-25 °C 低温冰箱(南京创维电器公司)、Fresco 21 离心机(德国 Eppendorf 公司)、Adventurer 高精度电子天平(上海奥豪斯仪器公司)和 PowerPac 电泳仪和电泳槽(美国 Bio-Rad 公司)。

聚合酶链式反应产物纯化回收试剂盒(美国 Axygen 公司)、琼脂糖(美国 Invitrogen 公司)、2×Taq Master 混合酶和 FastPure 病毒核酸小型试剂盒(诺唯赞生物科技股份有限公司)、6×甘油凝胶上样缓冲液(生工生物工程(上海)股份有限公司)、cDNA 第一链合成试剂盒(碧云天生物科技公司)以及 DL1000 DNA Marker 和 DL2000 DNA Marker(宝日医生物技术(北京)有限公司)。

### 1.3 样品核酸提取

称取 0.15 g 猪粪便样本加入到 1.5 mL 的 1×PBS 缓冲液中,振荡搅匀 2 min,4 °C 静置 10 min,再以 12000 r/min 离心 8 min 获得上清液。参照 FastPure Viral DNA/RNA 小量试剂盒说明书,取 200 μL 上层清液加入 500 μL 的 Buffer VL,然后用移液枪轻轻混合均匀,转移上述实验的混合液至配套过滤柱中,12000 r/min 离心 1 min,弃除滤液;加入 600 μL 的 Buffer RW,12000 r/min 离心 30 s 进行洗脱弃滤液;重复上一步洗脱离心弃滤液,随后 12000 r/min 离心 3 min,将过滤柱转移至 1.5 mL 的专用收集管中,向过滤膜中央加入 50 μL DEPC 处理的 ddH<sub>2</sub>O,迅速盖上收集管,常温 3 min,最后 12000 r/min 离心 90 s 洗脱获得病毒核酸。

### 1.4 反转录

依照碧云天 cDNA 第一链合成试剂盒说明书,取 5 μL 病毒核酸,加入 1 μL 随机引物和 6 μL DEPC 处理的 ddH<sub>2</sub>O,用移液枪轻轻混匀后低速离心,65 °C 孵育 5 min 在聚合酶链式反应仪器进行;结束反应后,静置冰上冷却 2~4 min,随后加入 4 μL 反应 Buffer、1 μL 的 RNase 抑制剂、2 μL 的

dNTP 混合物和 1  $\mu\text{L}$  碧云天 M-MLV 反转录酶,混合均匀再微离心;最后放进聚合酶链式反应仪器,通过 25  $^{\circ}\text{C}$  孵育 10 min、50  $^{\circ}\text{C}$  孵育 60 min 和 80  $^{\circ}\text{C}$  孵育 10 min 获得病毒 cDNA。

### 1.5 引物设计

从 NCBI (National center for biotechnology information) 数据库中下载 PSV 病毒目前所有的全基因组序列,使用 Lasergene 7 软件进行序列对比与同源性分析,选出该病毒保守性高的 3D 基因,采用 Primer Premier 5.0 软件设计检测病毒的特异性引物。上游引物 PSV-F: 5'-TTATTGGTTGCCT-ATCCYT-3', 下游引物 PSV-R: 5'-CYTCATARA-CCTCCTCACC-3', 目的条带为 307 bp, 引物合成来自金唯智(苏州)生物公司。

### 1.6 质粒模板定量及稀释

待 PSV 质粒解冻后,使用紫外分光仪 Nanodrop 2000 测量浓度,根据质粒拷贝数计算方法,将 PSV 质粒模板浓度调整为  $5 \times 10^9$  拷贝/ $\mu\text{L}$ ,再以 10 倍浓度进行梯度稀释,直至稀释为 0.5 拷贝/ $\mu\text{L}$ ,稀释后的 PSV 质粒模板放  $-25^{\circ}\text{C}$  冰箱保存备用。

### 1.7 聚合酶链式反应优化

参考本课题组先前建立的聚合酶链式反应体系和反应参数<sup>[21-22]</sup>,循环数为 40 次具有较好的扩增效率,后续主要优化反应程序的退火温度(45~70  $^{\circ}\text{C}$ )。聚合酶链式反应体系为:2  $\times$  Taq Master 混合酶 7.5  $\mu\text{L}$ , 1.0  $\mu\text{L}$  病毒质粒模板( $5 \times 10^4$  拷贝/ $\mu\text{L}$ ), 0.5  $\mu\text{L}$  上/下游引物(浓度 10  $\mu\text{mol/L}$ ), 加

5.5  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O。将混合液用移液枪轻轻混匀后低速离心,反应程序:95  $^{\circ}\text{C}$  3 min; 95  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 45~70  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 40 次循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  5 min, 聚合酶链式反应扩增产物通过 1.5% 琼脂糖凝胶电泳进行分析。

### 1.8 特异性分析

根据优化后的聚合酶链式反应体系和反应参数,对 PSV 和非靶标病毒(PEDV、PTV、PCV2、PToV、PBoV、TGEV、PAstV 和 RVA)进行特异性实验分析,阴性对照用 ddH<sub>2</sub>O 作为模板。

### 1.9 灵敏度分析

将不同浓度 PSV 质粒模板( $5 \times 10^{-1} \sim 5 \times 10^6$  拷贝/ $\mu\text{L}$ )分别加入反应体系中, ddH<sub>2</sub>O 为模板用作阴性对照,通过最低检测浓度的结果判断灵敏度。

### 1.10 样品检测

应用上述建立的聚合酶链式反应方法检测 88 个健康猪粪便样本,检测阳性的聚合酶链式反应产物由生工生物工程(上海)股份有限公司测序验证。

## 2 结果与分析

### 2.1 退火温度优化

对 PSV 质粒模板( $5 \times 10^4$  拷贝/ $\mu\text{L}$ )进行退火温度优化,结果如图 1 所示。从图 1 中可以看出:在 45.0~59.9  $^{\circ}\text{C}$  条件下均能特异性地扩增目的片段产生,而 45.0、46.8、49.8  $^{\circ}\text{C}$  与 54.4  $^{\circ}\text{C}$  温度下目的片段最亮。从引物特异性、灵敏度和二聚体形成等因素考虑,最终选择 49.8  $^{\circ}\text{C}$  作为最佳退火温度。

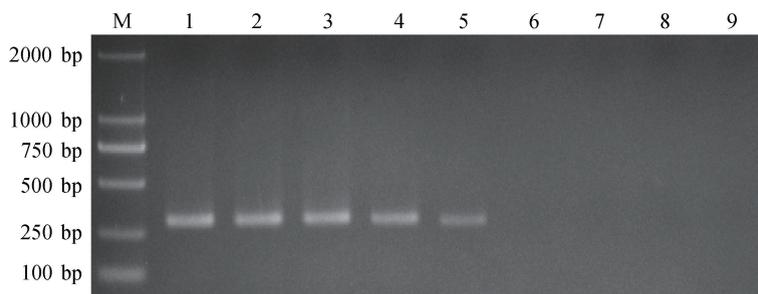


图 1 不同退火温度扩增 PSV 电泳图

注: M 为 DL2000 DNA Marker; 1—8 分别表示退火温度为 45.0、46.8、49.8、54.4、59.9、64.8、68.0  $^{\circ}\text{C}$  和 70.0  $^{\circ}\text{C}$  时的电泳图; 9 表示阴性对照。

### 2.2 特异性分析

根据上述已优化聚合酶链式反应循环参数,分别将 PSV 质粒、其他非靶标猪腹泻病毒(PEDV、PTV、PCV2、PToV、PBoV、TGEV、PAstV 和 RVA)和 ddH<sub>2</sub>O 作为模板进行反应,检测 PSV 聚合酶链式反应方法的特异性(见图 2)。

图 2 显示:以 PSV 质粒为模板可扩增出清晰单一的目的条带,而另外 8 种非靶标猪腹泻病毒(PEDV、PTV、PCV2、PToV、PBoV、TGEV、PAstV 和 RVA)和 ddH<sub>2</sub>O 中均无条带产生,表明建立的 PSV 聚合酶链式反应方法具有良好的特异性。

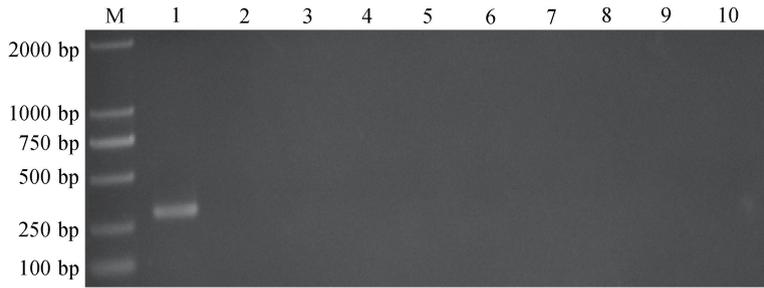


图 2 PSV 聚合酶链式反应检测方法扩增不同病毒电泳图

注:M 为 DL2000 DNA Marker;1. PSV;2. PEDV;3. PTV;4. PCV2;  
5. PToV;6. PBoV;7. TGEV;8. PAstV;9. RVA;10. 阴性对照。

### 2.3 灵敏性分析

将不同浓度 ( $5 \times 10^{-1} \sim 5 \times 10^6$  拷贝/ $\mu\text{L}$ ) 的 PSV 质粒作为模板,按照优化的聚合酶链式反应条件进行扩增,通过凝胶成像结果判断最低检测浓度,结果如图 3 所示。由图 3 可知:目的片段的亮度随

着 PSV 质粒模板浓度的降低而逐渐减弱,检测低限为 5 拷贝/ $\mu\text{L}$ ,条带清晰单一且阴性对照中无条带产生,表明建立的 PSV 聚合酶链式反应方法灵敏性较高。

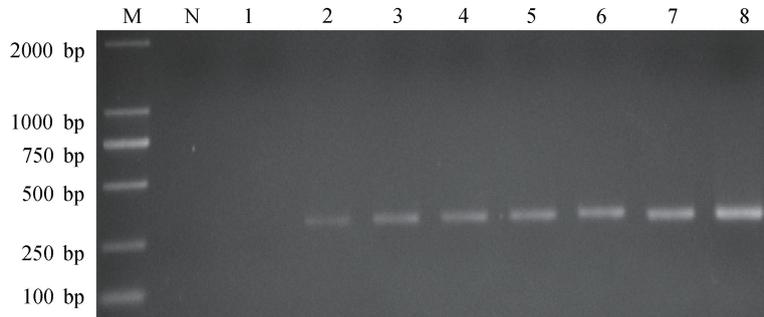


图 3 PSV 聚合酶链式反应检测方法扩增不同浓度 PSV 电泳图

注:M 为 DL2000 DNA Marker;1-8 代表不同浓度的 PSV 质粒模板;1.  $5 \times 10^{-1}$  拷贝/ $\mu\text{L}$ ;2.  $5 \times 10^0$  拷贝/ $\mu\text{L}$ ;3.  $5 \times 10^1$  拷贝/ $\mu\text{L}$ ;  
4.  $5 \times 10^2$  拷贝/ $\mu\text{L}$ ;5.  $5 \times 10^3$  拷贝/ $\mu\text{L}$ ;6.  $5 \times 10^4$  拷贝/ $\mu\text{L}$ ;7.  $5 \times 10^5$  拷贝/ $\mu\text{L}$ ;8.  $5 \times 10^6$  拷贝/ $\mu\text{L}$ ;N. 阴性对照。

### 2.4 样品检测

利用上述建立的 PSV 聚合酶链式反应方法对 88 个健康猪粪便样品 cDNA 进行检测,通过琼脂糖凝胶电泳结果判断是否为 PSV 阳性(见图 4)。图 4 表明:从 88 个样品中共检出 7 个阳性,阳性率为 7.95%;7 个阳性样品的聚合酶链式反应扩增产物测序验证,经 BLAST 对比均为 PSV 病毒的靶标序列。

## 3 讨论

PSV 是一种可引起猪腹泻的主要猪肠道病毒,常与其他猪腹泻病毒混合感染,导致感染猪的临床症状较为复杂;而且,怀孕母猪一旦感染该病毒可能导致胎儿流产或产下死胎,对养殖业危害较大<sup>[11]</sup>。因此,本文针对 PSV 建立了快捷高效、准确可靠、成本低廉的聚合酶链式反应检测方法,对 PSV 早期临床诊断具有重要意义。

引物设计对聚合酶链式反应检测方法的建立

极其重要,往往可以决定该方法的特异性、灵敏性和广泛适用性。近年来,随着越来越多的 PSV 变异株序列被发现公开<sup>[5,23-24]</sup>,早期针对 PSV 检测的引物可能存在扩增效率或灵敏度不高的情况。本文建立了一种可检测高变异株在内的高特异性 PSV 聚合酶链式反应方法,首先根据已报道的 PSV 全基因组序列,通过对 PSV 全基因组序列比对与同源性分析,选择保守性高的 3D 基因序列设计一对特异性引物,并针对个别多态性位点进行了简并碱基处理,理论上可检测所有已知的 PSV;同时优化了退火温度。本文建立的聚合酶链式反应方法可特异性扩增 PSV,产生清晰单一的目的条带,并且对非靶标猪腹泻病毒(PEDV、PTV、PCV2、PToV、PBoV、TGEV、PAstV 和 RVA)未产生交叉反应。该检测方法灵敏性较强,检测最低极限为 5 拷贝/ $\mu\text{L}$ ,高于杨涛涛<sup>[25]</sup>建立的 PSV 常规聚合酶链式反应和李倩倩等<sup>[11]</sup>建立的 TaqMan 实时荧光定量聚合酶链式反应灵敏度(分别为

58.9 拷贝/ $\mu\text{L}$  和 38.8 拷贝/ $\mu\text{L}$ ), 远高于孙杰等<sup>[18]</sup>和 Wang 等<sup>[26]</sup>建立的 PSV 常规聚合酶链式反应灵敏度( $4 \times 10^3$  拷贝/ $\mu\text{L}$  和  $10^3$  拷贝/ $\mu\text{L}$ ), 略

高于张路文<sup>[27]</sup>和 Wang 等<sup>[26]</sup>分别建立的 SYBR Green I 荧光定量聚合酶链式反应(13.4 拷贝/ $\mu\text{L}$  和 10 拷贝/ $\mu\text{L}$ )。

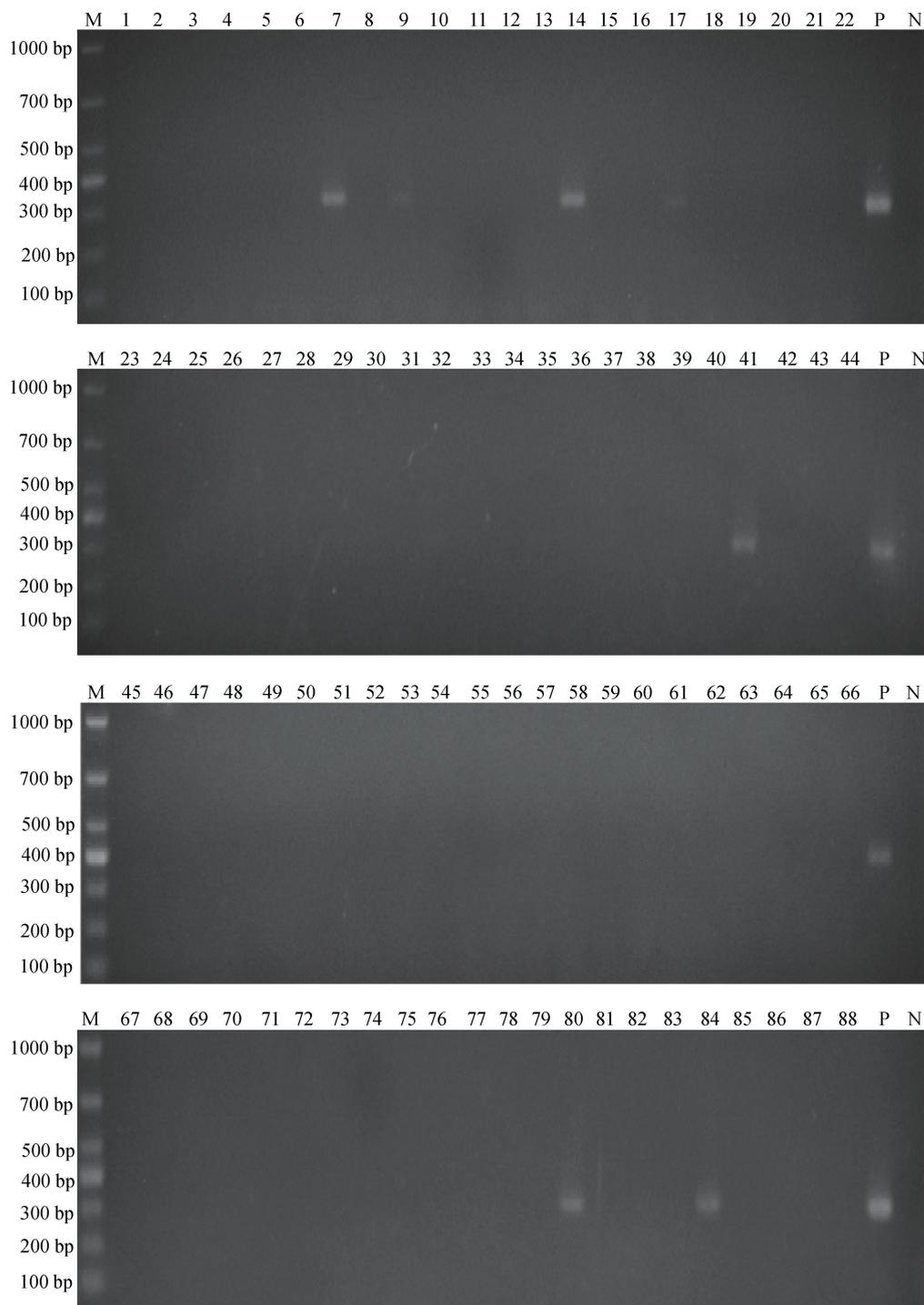


图4 PSV 聚合酶链式反应检测方法扩增猪粪便样品 cDNA 电泳图

注: M 为 DL1000 DNA Marker; 胶孔 1~88 分别代表不同猪粪便样品 cDNA; P 为 PSV 病毒模板; N 为阴性对照。

近年来, PSV 在腹泻猪群中的阳性检出率高达 17.7%~34.0%<sup>[19,28-30]</sup>, 已成为导致猪群腹泻的重要病毒之一。此外, 也有不少关于健康猪群中检出 PSV 的报道。兰道亮等<sup>[31]</sup>检测了中国华东地区的

960 个健康猪粪便样本, PSV 阳性率为 17.2%。杨涛涛<sup>[25]</sup>对湖南地区 362 头健康猪的临床样品进行 PSV 检测, 发现阳性率为 19.06%。张备等<sup>[20]</sup>对国内部分省市的 42 个健康猪粪便样本进行检测, PSV

阳性率为 2.38%。Buitrago 等<sup>[9]</sup>对西班牙 206 份健康猪粪便样品进行检测,PSV 阳性率为 9%。采用本文建立的 PSV 聚合酶链式反应方法检测浙江地区采集的 88 个健康猪粪便样本,发现健康猪群中 PSV 的阳性率为 7.95%,腹泻猪群和健康猪群均可出现 PSV 感染,并且健康猪群中的 PSV 阳性率并不低;这需要引起重视,及早进行诊断与防控。

## 4 结 论

本文针对 PSV 保守性高的 3D 基因建立了一种聚合酶链式反应检测方法,分析了该方法的特异性和灵敏度,应用该方法检测了浙江地区的 88 个健康猪粪便样本,并对比分析了其他地区的腹泻猪群或健康猪群中 PSV 感染情况,为 PSV 流行病学调查研究提供了技术借鉴,主要结论如下:

a)该方法可特异性扩增 PSV,最低极限为 5 拷贝/ $\mu\text{L}$ ,灵敏度远高于报道的 PSV 常规聚合酶链式反应,可用于检测早期低浓度样品中的 PSV。

b)PSV 不仅在腹泻猪群中的阳性检出率较高,而且某些地区健康猪群中的阳性检出率也较高。

## 参考文献:

[1] Tseng C H, Tsai H J. Sequence analysis of a duck picornavirus isolate indicates that it together with porcine enterovirus type 8 and simian picornavirus type 2 should be assigned to a new picornavirus genus[J]. *Virus Research*, 2007, 129(2): 104-114.

[2] Ibrahim Y M, Zhang W, Werid G M, et al. Isolation, characterization, and molecular detection of porcine sapelovirus[J]. *Viruses*, 2022, 14(2): 349.

[3] Prodělalová J. The survey of porcine teschoviruses, sapeloviruses and enteroviruses B infecting domestic pigs and wild boars in the Czech Republic between 2005 and 2011[J]. *Infection, Genetics and Evolution*, 2012, 12(7): 1447-1451.

[4] Arruda P H, Arruda B L, Schwartz K J, et al. Detection of a novel sapelovirus in central nervous tissue of pigs with polioencephalomyelitis in the USA[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2017, 64(2): 311-315.

[5] Chen Q Y, Sun Z H, Che Y L, et al. High prevalence, genetic diversity, and recombination of porcine sapelovirus in pig farms in Fujian, southern China[J]. *Viruses*, 2023, 15(8): 1751.

[6] Chelli E, De Sabato L, Vaccari G, et al. Detection and

characterization of porcine sapelovirus in Italian pig farms[J]. *Animals (Basel)*, 2020, 10(6): 966.

[7] Li Y, Du L, Jin T, et al. Characterization and epidemiological survey of porcine sapelovirus in China[J]. *Veterinary Microbiology*, 2019, 232: 13-21.

[8] Lan D, Ji W, Yang S, et al. Isolation and characterization of the first Chinese porcine sapelovirus strain[J]. *Archives of Virology*, 2011, 156(9): 1567-1574.

[9] Buitrago D, Cano-Gómez C, Agüero M, et al. A survey of porcine picornaviruses and adenoviruses in fecal samples in Spain[J]. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2010, 22(5): 763-766.

[10] 赵婷婷, 李晶娇, 沈小娟, 等. 猪萨佩罗病毒研究进展[J]. *上海交通大学学报(农业科学版)*, 2017, 35(6): 62-66.

[11] 李倩倩, 赵福杰, 丁庆文, 等. 猪萨佩罗病毒 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2021, 49(11): 10-16.

[12] 李娜娜, 陶洁, 李本强, 等. 猪萨佩罗病毒 VP1 蛋白的原核表达及其间接 ELISA 方法的建立[J]. *中国兽医科学*, 2021, 51(4): 435-440.

[13] 彭旺. 猪萨佩罗病毒抗体检测方法的建立与初步应用[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2017: 27-53.

[14] 彭旺, 唐小明, 葛猛, 等. 猪萨佩罗病毒间接免疫荧光方法的建立与初步应用[J]. *湖南农业大学学报(自然科学版)*, 2017, 43(4): 423-426.

[15] Chen Q, Li G W, Stasko J, et al. Isolation and characterization of porcine epidemic diarrhea viruses associated with the 2013 disease outbreak among swine in the United States [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2014, 52(1): 234-243.

[16] Duan Y, Miao L, Ye H, et al. A faster immunofluorescence assay for tracking infection progress of human cytomegalovirus[J]. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2012, 44(7): 597-605.

[17] Soltan M A, Tsai Y-L, Lee P-Y A, et al. Comparison of electron microscopy, ELISA, real time RT-PCR and insulated isothermal RT-PCR for the detection of Rotavirus group A (RVA) in feces of different animal species [J]. *Journal of Virological Methods*, 2016, 235: 99-104.

[18] 孙杰, 刘畅, 朱琳, 等. 猪萨佩罗病毒 RT-PCR 检测方法的建立与应用[J]. *畜牧与兽医*, 2018, 50(7): 118-121.

[19] 丁庆文, 闫晓光, 张红垒, 等. 猪  $\delta$  冠状病毒、猪流行性腹泻病毒和猪萨佩罗病毒多重 RT-PCR 检测方法的建立及初步临床应用[J]. *中国预防兽医学报*, 2021, 43(6): 615-620.

[20] 张备, 李春秋, 苏明俊, 等. 中国几省市猪萨佩罗病毒

- 巢式 RT-PCR 检测与遗传进化分析[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2019, 31(3): 32-37.
- [21] 刘芹, 张秋桠, 姜永厚. 白斑综合征病毒 PCR 检测方法的建立及初步应用[J]. 浙江理工大学学报(自然科学), 2023, 49(5): 645-650.
- [22] 张秋桠, 刘高鹏, 刘芹, 等. 猪流行性腹泻病毒 RT-PCR 检测方法的建立[J]. 浙江理工大学学报(自然科学), 2022, 47(4): 629-634.
- [23] Ibrahim Y M, Zhang W, Wang X, et al. Molecular characterization and pathogenicity evaluation of enterovirus G isolated from diarrheic piglets [J]. *Microbiology Spectrum*, 2023, 11(6): e0264323.
- [24] Li C, Lu H, Geng C, et al. Epidemic and evolutionary characteristics of swine enteric viruses in South-Central China from 2018 to 2021[J]. *Viruses*, 2022, 14(7): 1420.
- [25] 杨涛涛. 湖南地区猪捷申病毒和猪萨佩罗病毒的分子流行病学和基因特性研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2018: 15-39.
- [26] Wang C, Yu D, Cui L, et al. Rapid and real-time detection of porcine sapelovirus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay [J]. *Journal of Virological Methods*, 2014, 203: 5-8.
- [27] 张路文. 猪萨佩罗病毒四川株 CHN-SCMY-2021 的分离鉴定及荧光定量 PCR 方法建立[D]. 成都: 四川农业大学, 2022: 34-45.
- [28] Son K Y, Kim D S, Matthijssens J, et al. Molecular epidemiology of Korean porcine sapeloviruses [J]. *Archives of Virology*, 2014, 159(5): 1175-1180.
- [29] 李雨濛, 郭博, 徐逸飞, 等. 四川省腹泻病猪的猪萨佩罗病毒检测及 1B 基因序列比较分析[J]. 浙江农业学报, 2016, 28(12): 1992-1999.
- [30] 李本强, 刘惠莉, 刘佳佳, 等. 上海地区猪萨佩罗病毒的检测及遗传进化分析[J]. 上海农业学报, 2023, 39(2): 64-70.
- [31] 兰道亮, 吉文汇, 王长松, 等. 华东部分地区猪群中猪萨佩罗病毒分子流行病学调查[J]. 动物医学进展, 2012, 33(12): 116-121.

(责任编辑:张会巍)