



# 基于基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱的猪呼吸道病毒多目标鉴定方法的建立和应用

宋士琦<sup>1</sup>, 裘慧<sup>2</sup>, 陈吴健<sup>2</sup>, 莫虹斐<sup>2</sup>, 金晨晨<sup>3</sup>, 曾若雪<sup>3</sup>, 王巍<sup>4</sup>, 郭惠民<sup>4</sup>, 帅江冰<sup>3\*</sup>, 王正亮<sup>1</sup>, 张晓峰<sup>2\*</sup>

- 1 中国计量大学生命科学学院, 浙江 杭州 310018
- 2 杭州海关技术中心, 浙江 杭州 311202
- 3 浙江省检验检疫科学技术研究院, 浙江 杭州 310016
- 4 浙江迪谱诊断技术有限公司, 浙江 杭州 311100

宋士琦, 裘慧, 陈吴健, 莫虹斐, 金晨晨, 曾若雪, 王巍, 郭惠民, 帅江冰, 王正亮, 张晓峰. 基于基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱的猪呼吸道病毒多目标鉴定方法的建立和应用[J]. 微生物学报, 2023, 63(7): 2713-2727.

SONG Shiqi, QIU Hui, CHEN Wujian, MO Hongfei, JIN Chenchen, ZENG Ruoxue, WANG Wei, GUO Huimin, SHUAI Jiangbing, WANG Zhengliang, ZHANG Xiaofeng. Establishment and application of a multi-target detection method for porcine respiratory viruses based on MALDI-TOF MS[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2023, 63(7): 2713-2727.

**摘要:** 【目的】建立能高效同步鉴定猪伪狂犬病毒(porcine pseudorabies virus, PRV)、猪圆环病毒 2 型(porcine circovirus 2, PCV-2)和 3 型(porcine circovirus 3, PCV-3)、非洲猪瘟病毒(African swine fever virus, ASFV)以及猪博卡病毒 1 型(porcine bocavirus group 1, PBoV-G1)、2 型(porcine bocavirus group 2, PBoV-G2)和 3 型(porcine bocavirus group 3, PBoV-G3)等呼吸道病毒的核酸基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS)高通量多目标检测技术。【方法】根据 7 种病原体基因的保守序列, 分别设计不同病原的引物及对应的单碱基延伸探针, 通过引物浓度和反应条件优化, 方法特异性、敏感性和稳定性分析, 以及临床样本和猪源产制品的检测验证, 建立常见猪呼吸道 DNA 病毒的 MALDI-TOF MS 多目标检测体系。【结果】质谱分析显示, 多目标检测体系的 7 种靶标产物峰只在特定病毒阳性样品检测时产生, 与其他病原体检测无交叉反应, 表明该方法对 7 种靶标病毒检

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFF0602800); 浙江省重点研发计划(2021C02060); 海关总署科技计划项目(2021HK159)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFF0602800), the Zhejiang Provincial Key Research and Development Program (2021C02060), and the Scientific Research Projects of the General Administration of Customs(2021HK159).

\*Corresponding authors. E-mail: ZHANG Xiaofeng, zxf@zaiq.org.cn; SHUAI Jiangbing, sjb@zaiq.org.cn

Received: 2022-10-17; Accepted: 2022-11-24; Published online: 2022-12-01

测特异性良好。重复性试验结果分析显示, 体系中每种病毒在高、中、低浓度时批内阳性符合率均 $\geq 98.0\%$ , 批间均 $\geq 98.3\%$ , 表明该方法具有较高的稳定性。体系中7种病原体每种病毒最低检测限在8.65–26.27拷贝/ $\mu\text{L}$ 之间, 与荧光PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR)检测相当。采用MALDI-TOF MS多重检测方法对100份组织、饲料和猪肉样品进行检测应用, 检出2种及以上混合感染样品39份, 其中5份样本同步检出5种病原体阳性; 对8份ASFV-p72假病毒人工污染样品进行验证, 均可检出ASFV阳性。将以上样本检测应用结果与荧光PCR方法进行比对验证, 2种方法对于不同病原体检测结果的符合率高达94.4%–100%。【结论】本研究建立的基于MALDI-TOF MS的猪呼吸道常见DNA病毒多重检测方法为猪群相关疫病快速监测和鉴别诊断, 以及便利化进出口动物检疫等提供了一种新的敏感、特异的高通量多目标检测技术。

**关键词:** 猪呼吸道病毒; 基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS); 高通量检测

## Establishment and application of a multi-target detection method for porcine respiratory viruses based on MALDI-TOF MS

SONG Shiqi<sup>1</sup>, QIU Hui<sup>2</sup>, CHEN Wujian<sup>2</sup>, MO Hongfei<sup>2</sup>, JIN Chenchen<sup>3</sup>, ZENG Ruoxue<sup>3</sup>, WANG Wei<sup>4</sup>, GUO Huimin<sup>4</sup>, SHUAI Jiangbing<sup>3\*</sup>, WANG Zhengliang<sup>1</sup>, ZHANG Xiaofeng<sup>2\*</sup>

1 College of Life Sciences, China Jiliang University, Hangzhou 310018, Zhejiang, China

2 Hangzhou Customs Technical Center, Hangzhou 311202, Zhejiang, China

3 Zhejiang Academy of Science & Technology for Inspection & Quarantine, Hangzhou 310016, Zhejiang, China

4 Zhejiang Digena Diagnostic Technology Co., Ltd., Hangzhou 311100, Zhejiang, China

**Abstract:** [Objective] To establish a high-throughput multi-target technique based on matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) for the detection of porcine pseudorabies virus (PRV), porcine circovirus types 2 (PCV-2) and 3 (PCV-3), African swine fever virus (ASFV), and porcine bocavirus group 1 (PBoV-G1), group 2 (PBoV-G2) and group 3 (PBoV-G3). [Methods] The primers for different pathogens and corresponding single-base extension probes were designed based on the conserved sequences in the genes of the seven pathogens. After the optimization of primer concentrations and reaction conditions, the specificity, sensitivity, and repeatability of the method were analyzed. Finally, this MALDI-TOF MS method was used to detect the pathogens in clinical samples and porcine products. [Results] The established method only produced target peaks in the detection of specific virus-positive samples, and there was no cross-reaction with other pathogens, which indicated that the method had good specificity for the detection of the seven target viruses. The repeatability test results showed that the positive coincidence rate of each virus in high, medium, and low concentrations was  $\geq 98.0\%$  within batches and  $\geq 98.3\%$  between batches, indicating that the method had high repeatability. The

low limits of detection of the established method for the seven pathogens in the system were within the range of 8.65–26.27 copies/ $\mu\text{L}$ , which was comparable to that of the real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR). The established MALDI-TOF MS method was used to detect 100 tissue, feed, and pork samples, in which 39 samples were detected with two or more mixed infections, including five samples simultaneously positive for five pathogens. In addition, eight samples of artificial contamination with recombinant adenovirus carrying ASFV-p72 gene were tested, which showed ASFV-positive results. The coincidence rates of the results obtained by MALDI-TOF MS and RT-qPCR for the detection of different pathogens were as high as 94.4%–100%. **[Conclusion]** The method established based on MALDI-TOF MS for the detection of multiple porcine respiratory DNA viruses in this study provides a sensitive, specific, high-throughput and multi-target detection technique for rapid surveillance and differential diagnosis of porcine diseases, facilitating the import and export animal quarantine.

**Keywords:** porcine respiratory virus; matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS); high-throughput detection

猪病毒性呼吸道疾病和繁殖障碍疾病是制约现代养猪业规模化和集约化发展的重要因素,不同猪呼吸道及繁殖障碍疾病在猪群间常出现混合感染和继发感染,并呈地方流行性发生,而其中很大部分猪病为 2 种或 2 种以上病原体造成<sup>[1]</sup>,例如猪伪狂犬病毒(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)、猪博卡病毒(porcine bocavirus, PBoV)和非洲猪瘟病毒(African swine fever virus, ASFV)等。PCV、PBoV 可引起猪只呼吸系统疾病,PCV、PRV 可导致猪只繁殖障碍性疾病的发生;而 ASFV 可导致猪只感染高度接触性传染病非洲猪瘟(African swine fever),其强毒株致死率达 100%,且病原学和流行病学十分复杂<sup>[2]</sup>。由于这些病原体导致的猪病发病机制与临床症状较为相像,给疫病防控带来较大阻碍,也使得多种病原体的高通量快速检测成为疫病防控的重点环节。

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱

(matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS)是一种新型生物大分子检测技术,它将生物大分子与基质分子结合生成共结晶,在激光轰击后根据质荷比对分析样本进行区分和检测<sup>[3]</sup>。即通过与多重 PCR 联用,针对扩增后的多靶标核酸片段分别设计对应的延伸探针(unextended extension probe, UEP)进行单碱基延伸,延伸后的产物经 MALDI-TOF MS 分析检测,得到不同特异性核酸片段的质量信号,从而对同一样本进行多靶标同步鉴别检测<sup>[3-4]</sup>。MALDI-TOF MS 技术最多一次可同时对 2×386 个样本进行多目标检测,每个反应最多可检测 40 个靶目标,大大提高了检测鉴定的效率。

MALDI-TOF MS 在病原微生物的临床检测中已有较多应用,并在病原体高通量检测及分型诊断中展现出良好的前景<sup>[5-8]</sup>。Liu 等建立了可以同时检测和区分 7 种人类冠状病毒(human coronavirus, HCoV)的核酸质谱检测方

法<sup>[9]</sup>, 检测限为 1–5 个拷贝/反应, 为 HCoV 的大规模筛查提供了技术平台; 刘宏钱等<sup>[10]</sup>建立了人呼吸道症候群相关病毒 MALDI-TOF MS 多目标检测技术, 可同时对 27 种呼吸道病原体进行检测, 灵敏度达  $10^1$ – $10^3$  拷贝/ $\mu\text{L}$ 。在动物疫病诊断方面, Liu 等建立了 10 种鸭源性致病病毒的 MALDI-TOF MS 同步检测方法, 体系的最低检测限均可达 10 拷贝/ $\mu\text{L}$ <sup>[11]</sup>。本研究针对 PRV、PCV-2、PCV-3、PBoV-G1、PBoV-G2、PBoV-G3 和 ASFV 等常见的猪呼吸道 DNA 病毒设计多重引物及延伸探针, 建立了能同步鉴定 7 种常见猪呼吸道病毒的 MALDI-TOF MS 高通量多目标技术体系, 为猪群相关疫病监测和鉴别诊断以及进出口动物检疫提供了一种新的高效手段。

## 1 材料与方法

### 1.1 病毒

猪瘟病毒(classical swine fever virus, CSFV, C 株)灭活疫苗和猪流感病毒(swine influenza virus, SIV, TJ 株)灭活疫苗购自武汉科前生物股份有限公司, 口蹄疫病毒(foot and mouth disease virus, FMDV)灭活疫苗购自金宇生物技术股份有限公司。猪繁殖与呼吸综合征病毒(porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)、伪狂犬病毒(pseudorabies virus, PRV, Bartha 株)、猪流行性腹泻病毒(porcine epidemic diarrhea virus, PEDV) CV777 株及 PCV 2 (JH SRJ 株)由浙江大学惠赠, 猪细小病毒(PPV)阳性样本由浙江农林大学惠赠, PCV 3、PBoV-G1、PBoV-G2、PBoV-G3 等阳性样本由本实验室保存。含 ASFV-p72 全基因包被的腺病毒于生工生物工程(上海)股份有限公司订制。按 TaKaRa MiniBEST Viral RNA/DNA Extraction Kit 配套

试剂说明书对样品进行核酸的纯化提取, 并将 DNA 或反转录后的 cDNA 模板于  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  保存备用。

### 1.2 试剂及仪器

TaKaRa MiniBEST Viral RNA/DNA Extraction Kit Ver.5.0、PrimeScript™ IV 1st strand cDNA Synthesis Mix 购自宝日生物技术(北京)有限公司; 10×PCR Buffer Reagent Set、SAP Reagent Set、Iplex Pro Reagent Set 购自 Agena Bioscience 公司; 荧光 PCR 引物及探针由生工生物工程(上海)股份有限公司定制; 病毒 DNA/RNA 提取试剂盒 4.0 及 NP968-C 全自动核酸提取仪购自西安天隆科技有限公司; Qubit 4 荧光计、ProFlex PCR 仪、QuantStudio 5 实时荧光定量 PCR 仪购自 Thermo Fisher 公司; DP-TOF 核酸质谱仪来自浙江迪谱诊断技术有限公司。

### 1.3 引物和质量探针的设计与合成

根据 GenBank 发表的相关病毒基因序列, 通过 MEGA-X 进行多重序列对比, 分别选择 PRV 的 *gB* 基因、PCV-2 的 *rep* 基因、PCV-3 的 *cap* 基因、PBoV 的 *NP1* 基因、ASFV 的 *p72* 基因保守区域进行引物设计。其中 PBoV 按 Jiang 等<sup>[12]</sup>及覃绍敏等<sup>[13]</sup>的病毒分型方法, 根据 *NP1* 基因的保守区域对 PBoV-G1、PBoV-G2、PBoV-G3 三个基因群分别进行引物设计。使用 Primer 3 及 MassARRAYAssay® Design Suite (Agena)设计用于病毒检测的特异性 PCR 引物及相应的延伸探针(UEP), 其中每条 PCR 引物的 5'端加入 10 个碱基的 tag (ACGTTGGATG)以避免多重引物对质谱出峰位置的干扰, 并用 Primer-BLAST 对所设计引物进行特异性检验。所选目的基因、引物序列及质量信息见表 1。全部引物及探针均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成和纯化。

表 1 MALDI-TOF MS 检测体系的 7 组引物及探针

Table 1 Seven sets of primers and probes of MALDI-TOF MS detection system

Species	Target gene	Sequence of primer (5'→3')	Mass probe extension	Mass probe mass (Da)	Extended mass probe mass (Da)
PRV	<i>gB</i>	F: ACGTTGGATGGCGGGTACGTGTACTACGA R: ACGTTGGATGAGCGTCAGGTTACAGGGTCAC	GGGCCGTGTACTACGAGGACTA	6 801.4	7 048.6
PCV-2	<i>rep</i>	F: ACGTTGGATGTTGACTGTAGAGACTAAAGG R: ACGTTGGATGGCAGTTGAGGAGTACCATT	TTTTTTGGCCCGCAGTATT	5 776.8	6 023.9
PCV-3	<i>cap</i>	F: ACGTTGGATGATGAAAGTTACTCAGCCC R: ACGTTGGATGCGTCTAGATCTATGGCTGTG	TACAATCAGCCCTGTAATTTCTC	6 934.5	7 181.7
PBoV-G1	<i>NP1</i>	F: ACGTTGGATGCGACTCCAACCTCCGATGTC R: ACGTTGGATGGAGATCGAGCTATAACAACCG	GGCCCACTCCGATGTCGGCTCT	6 993.5	7 320.6
PBoV-G2	<i>NP1</i>	F: ACGTTGGATGTCTCCTCCATGTCGCTGAAG R: ACGTTGGATGAGCCCATCGTGCTCCACTG	ATGAAGTCACTCGGGAT	5 235.4	5 522.6
PBoV-G3	<i>NP1</i>	F: ACGTTGGATGCGGTTCTCTCCTTACTCGAC R: ACGTTGGATGAAGACGTTCCATGCTCCCTC	GGTTCGAGTCAACGAGAGGTC	7 129.6	7 376.8
ASFV	<i>p72</i>	F: ACGTTGGATGGTGGAAAGGGTATGTAAGAGC R: ACGTTGGATGCCGTAACCTGCTCATGGTATC	GATGCAGAACTTTGATGGAA	6 206.1	6 477.3

#### 1.4 标准质粒构建

根据 GenBank 中公布的 PRV (KX880456.1)、PCV-2 (AY691169.1)、PCV-3 (NC\_031753.1)、PBoV-G1 (HQ223038.1)、PBoV-G2 (NC\_024453.2)、PBoV-G3 (NC\_016032.1) 和 ASFV (MN715134.1) 基因序列为模板, 参照引物扩增片段, 由生工生物工程(上海)股份有限公司分别构建 pUC-57 标准质粒。使用 Qubit 4 测得质粒的浓度并确认拷贝数, 分别为  $9.30 \times 10^9$  拷贝/ $\mu\text{L}$  (PRV)、 $1.17 \times 10^{10}$  拷贝/ $\mu\text{L}$  (PCV-2)、 $1.92 \times 10^{10}$  拷贝/ $\mu\text{L}$  (PCV-3)、 $3.63 \times 10^{10}$  拷贝/ $\mu\text{L}$  (PBoV-G1)、 $1.18 \times 10^{10}$  拷贝/ $\mu\text{L}$  (PBoV-G2)、 $3.89 \times 10^9$  拷贝/ $\mu\text{L}$  (PBoV-G3) 和  $1.74 \times 10^{10}$  拷贝/ $\mu\text{L}$  (ASFV), 按 10 倍梯度稀释成  $10^9$ – $10^0$  拷贝/ $\mu\text{L}$  水平共 10 个梯度, 此外将相同稀释倍数的 7 种质粒等体积混合为 10 组质粒混合液, 分装后置于  $-20^\circ\text{C}$  保存备用。

#### 1.5 单重反应试验

为了考察引物和延伸探针的反应状况及质谱结果, 以 1.4 中每种中浓度质粒( $10^4$  拷贝/ $\mu\text{L}$ )

为模板, 使用单重引物和延伸探针对单一质粒分别进行单靶点扩增试验, 同时设置 ddH<sub>2</sub>O 为空白对照组。

#### 1.6 多重体系反应条件优化

以 1.4 中高浓度混合质粒( $10^4$  拷贝/ $\mu\text{L}$ )为模板, 根据延伸效率  $E = S_{\text{产物峰}} / (S_{\text{UPE 残留峰}} + S_{\text{产物峰}})$  为指标对多重 PCR 扩增体系进行优化。引物及延伸探针初始浓度分别为  $0.5 \mu\text{mol/L}$ 、 $5 \mu\text{mol/L}$ , 以  $E \geq 0.8$  为标准分别调整多重引物和延伸探针的最适浓度, 进而优化体系的检测灵敏度, 获得只有单一产物峰的质量信号谱图。

七重 PCR 反应体系为  $5 \mu\text{L}$ , 采用表 1 引物进行 PCR 扩增。(1) 多重 PCR 反应: 将  $2 \mu\text{L}$  质粒与  $1.2 \mu\text{L}$  PCR mix、 $1 \mu\text{L}$  PCR 引物混合液进行混合, 用 ddH<sub>2</sub>O 补足至  $5 \mu\text{L}$ 。反应程序为  $95^\circ\text{C}$  2 min;  $95^\circ\text{C}$  15 s,  $60^\circ\text{C}$  30 s,  $72^\circ\text{C}$  60 s 进行 40 个循环; 最后  $72^\circ\text{C}$  5 min。(2) SAP 消化反应: 将扩增后的产物用虾碱性磷酸酶(shrimp alkaline phosphatase, SAP)补至  $7 \mu\text{L}$ ,  $37^\circ\text{C}$  40 min 将 PCR

步骤中多余的脱氧核糖核苷三磷酸 (deoxyribonucleoside triphosphate, dNTP) 消化为双脱氧核苷三磷酸 (dideoxyribonucleoside triphosphate, ddNTP), 以防止 dNTP 在后续步骤中作为反应物继续延伸。最后 85 °C 灭活 5 min。

(3) 延伸反应: 将消化后的产物加入表 1 延伸探针进行延伸反应。消化产物中加入 1  $\mu\text{L}$  延伸探针、0.2  $\mu\text{L}$  inplex buffer 及 0.2  $\mu\text{L}$  termination mix, 用 ddH<sub>2</sub>O 补至 9  $\mu\text{L}$ 。反应程序为 95 °C 30 s; 95 °C 5 s, 52 °C 5 s, 80 °C 5 s, 进行 40 个循环; 最后 72 °C 延伸 3 min。

将反应结束后的延伸产物转至 384 孔板, 用 ddH<sub>2</sub>O 补至 25  $\mu\text{L}$ , 10 000 r/min 离心 2 min。将离心后的 384 孔板放入质谱仪, 经过树脂脱盐处理后进行质谱检测。数据采集及分析由 MassARRAY Typer 软件完成。

### 1.7 特异性试验

将 1.1 中 PRV、PCV-2、PCV-3、PBoV 和 ASFV 等靶标病毒或假病毒 DNA, SIV、PRRSV、CSFV、FMDV 和 PPV 等非靶标常见猪病病毒 DNA 或 cDNA 做为模板, 进行 MALDI-TOF MS 多重检测体系的特异性试验。同时以 100 拷贝/ $\mu\text{L}$  的 PRV、PCV-2、PCV-3、PBoV-G1、PBoV-G2、PBoV-G3 和 ASFV 标准质粒混合模板为阳性对照, ddH<sub>2</sub>O 为阴性对照。若各非靶标病原体均无延伸产物峰, 靶标病原体及阳性对照中 PRV、PCV-2、PCV-3、PBoV-G1、PBoV-G2、PBoV-G3 及 ASFV 对应的延伸产物峰出现在特定位置, 且产物峰之间无交叉重叠, 则认为检测体系特异性良好。

### 1.8 敏感性试验

为了评价该方法的灵敏度, 将  $10^4$ 、 $10^3$ 、 $10^2$ 、50、25、10、5、2.5、1 拷贝/ $\mu\text{L}$  水平的 7 种靶标阳性质粒, 按同一浓度水平分别混合作为模板, 再根据优化后的 MALDI-TOF MS 多重体系

对进行检测分析, 每个梯度的混合质粒分别进行 20 次重复试验, 20 个重复均为阳性的最低浓度认定为 MALDI-TOF MS 多重检测体系对该种病毒的最低检测限(limit of detection, LOD)。

### 1.9 重复性试验

以高、中、低拷贝数( $10^6$ 、 $10^4$ 、 $10^2$  拷贝/ $\mu\text{L}$ ) 的混合质粒标准品为模板, 每组稀释度设置 50 个重复进行试验, 来评估 MALDI-TOF MS 法对每种病毒检测结果的批内重复性; 此外, 将上述混合质粒标准品在 3 个不同时间分别重复进行, 每个稀释度设置 20 个重复, 记录 3 批独立试验各稀释度质粒的检测结果, 以评价该方法的批间重复性。

### 1.10 样品检测应用

34 份组织或全血样本、42 份含猪源性成分饲料样品和 24 份新鲜猪肉样品由本实验室收集保存。8 份 ASFV 假病毒人工污染样品, 由 10 倍梯度稀释( $10^9$ – $10^2$  拷贝/ $\mu\text{L}$ ) 的 ASFV-p72 腺病毒逐一加入 5  $\mu\text{L}$  至 0.5 g 阴性猪肉中得到。

分别取 0.5 g 饲料、组织、猪肉或人工污染样品, 冻融 3 次后充分研磨, 按 1:10 置于 PBS 缓冲液, 10 000 r/min 离心 5 min 后取上清。全血样品冻融 3 次后, 10 000 r/min 离心 5 min 后取上清。按核酸提取仪 NP968-C 配套试剂说明书进行核酸的纯化提取, 并于 -20 °C 保存备用。使用本研究构建的 MALDI-TOF MS 多重检测体系对 108 份样本核酸进行检测, 此外, 使用荧光定量 PCR 方法对所有样本进行 PRV (GB/T 35911-2018)、PCV-2 (GB/T 35901-2018)、PCV-3 (T/CVMA 19-2020)、PBoV-G1、PBoV-G2、PBoV-G3<sup>[12]</sup> 和 ASFV (GB/T 18648-2020) 验证。按照真阳性数/(真阳性数+假阴性数) $\times$ 100% 计算阳性符合率; 真阴性数/(真阴性数+假阳性数) $\times$ 100% 计算阴性符合率; [(真阳性数+真阴性

数)/检测总数]×100%计算试验结果的总符合率,并对结果进行评价。

## 2 结果与分析

### 2.1 单重反应试验

以  $10^4$  拷贝/ $\mu\text{L}$  各靶标质粒为模板,使用单一引物及延伸探针进行单靶标扩增试验,可分别得到 7 种靶标以质量(mass)为横坐标,SNP 强度(intensity)为纵坐标的质谱图像。结果显示每种病毒均仅有延伸产物单峰(PBoV-G2: 5 522.6 Da; PCV-2: 6 023.9 Da; ASFV: 6 477.3 Da; PRV: 7 048.6 Da; PCV-3: 7 181.7 Da; PBoV-G1: 7 320.6 Da; PBoV-G3: 7 376.8 Da),其对应的阴性对照仅有延伸探针峰单峰(PBoV-G2: 5235.4 Da; PCV-2: 5 776.8 Da; ASFV: 6 206.1 Da; PRV: 6 801.4 Da; PCV-3: 6 934.5 Da; PBoV-G1: 6 993.5 Da; PBoV-G3: 7 129.6 Da),并且在质谱检测的范围内并未出现杂峰,表明 7 重体系中每种病毒的扩增引物及质量探针均可有效反应(图 1)。

### 2.2 多重反应体系的建立

为获得清晰的质谱信号分析谱图,对 PRV、PCV-2、PCV-3、PBoV-G1、PBoV-G2、PBoV-G3 和 ASFV 病毒的每组引物及延伸探针的浓度进行优化,最终得到多重体系各引物的最佳浓度分别为 0.6  $\mu\text{mol/L}$  (PRV)、0.7  $\mu\text{mol/L}$  (PCV-2)、0.7  $\mu\text{mol/L}$  (PCV-3)、0.6  $\mu\text{mol/L}$  (PBoV-G1)、0.6  $\mu\text{mol/L}$  (PBoV-G2)、0.5  $\mu\text{mol/L}$  (PBoV-G3)、0.5  $\mu\text{mol/L}$  (ASFV),延伸探针的最佳浓度分别为 6  $\mu\text{mol/L}$  (PRV)、5  $\mu\text{mol/L}$  (PCV-2)、5  $\mu\text{mol/L}$  (PCV-3)、5  $\mu\text{mol/L}$  (PBoV-G1)、3.5  $\mu\text{mol/L}$  (PBoV-G2)、6.5  $\mu\text{mol/L}$  (PBoV-G3)、5  $\mu\text{mol/L}$  (ASFV)。

每种靶标在 MALDI-TOF MS 多重反应体系的分析中对应延伸探针(UEP)和单碱基延伸产物 2 个峰位置,若延伸产物所对应的质量位置处

出现单峰且信噪比(signal to noise ratio, SNR) $\geq 6$ ,则表示检测结果为阳性,如无延伸产物峰或延伸产物峰 SNR  $< 6$  时则认为检测结果为阴性。以 ASFV 为例,阴性对照反应体系中的延伸探针未进行延伸反应,质谱图像中仅存在未被消耗的探针峰(图 2a);低浓度模板时(50 拷贝/ $\mu\text{L}$  阳性质粒),ASFV 延伸探针部分消耗,同时存在 ASFV 探针峰与产物峰(图 2b);当质粒模板浓度为 100 拷贝/ $\mu\text{L}$  时,延伸反应完全,ASFV 延伸探针全部转化为延伸产物,只存在 ASFV 产物峰(图 2C)。

### 2.3 特异性分析

分别以 PRV、PCV-2、PCV-3、PBoV 和 ASFV 等靶标病毒或假病毒 DNA,以及 SIV、PRRSV、CSFV、FMDV 和 PPV 等常见猪病病毒 DNA 或 cDNA 为模板,对 MALDI-TOF MS 多重体系进行特异性试验。结果显示,体系中 7 个靶标病毒在各自延伸产物处均分别产生单峰,且信号峰的 SNR 均 $\geq 6$ ,非靶标模板及空白对照组的延伸产物处无峰(SNR 均 $\leq 3$ ),只存在延伸探针峰(图 3),表明该方法能够准确识别目标病毒,且与其他非靶标病原无交叉反应,特异性好。

### 2.4 敏感性分析

为评价该方法的敏感性,将  $10^4$ 、 $10^3$ 、 $10^2$ 、50、25、10、5、2.5、1 拷贝/ $\mu\text{L}$  的 7 种靶标病毒的混合阳性质粒,进行 MALDI-TOF MS 多重体系检测分析,以 20 个重复均为阳性的最低浓度为每种靶标的 LOD。以  $10^2$  拷贝/ $\mu\text{L}$  混合阳性质粒为例, MALDI-TOF MS 多重体系检测结果可直观的展示 7 种靶标的检出(图 4)。结果显示,多重体系对 7 种靶标病毒的最低检测限分别为: PRV 22.66 拷贝/ $\mu\text{L}$ 、PCV-2 26.10 拷贝/ $\mu\text{L}$ 、PCV-3 10.66 拷贝/ $\mu\text{L}$ 、PBoV-G1 20.15 拷贝/ $\mu\text{L}$ 、PBoV-G2 26.27 拷贝/ $\mu\text{L}$ 、PBoV-G3 8.65 拷贝/ $\mu\text{L}$  和 ASFV 9.68 拷贝/ $\mu\text{L}$  (图 5),反应体系中每种靶标的检测浓度均可达到  $10^1$  拷贝/ $\mu\text{L}$  水平,与荧光 PCR 相当。

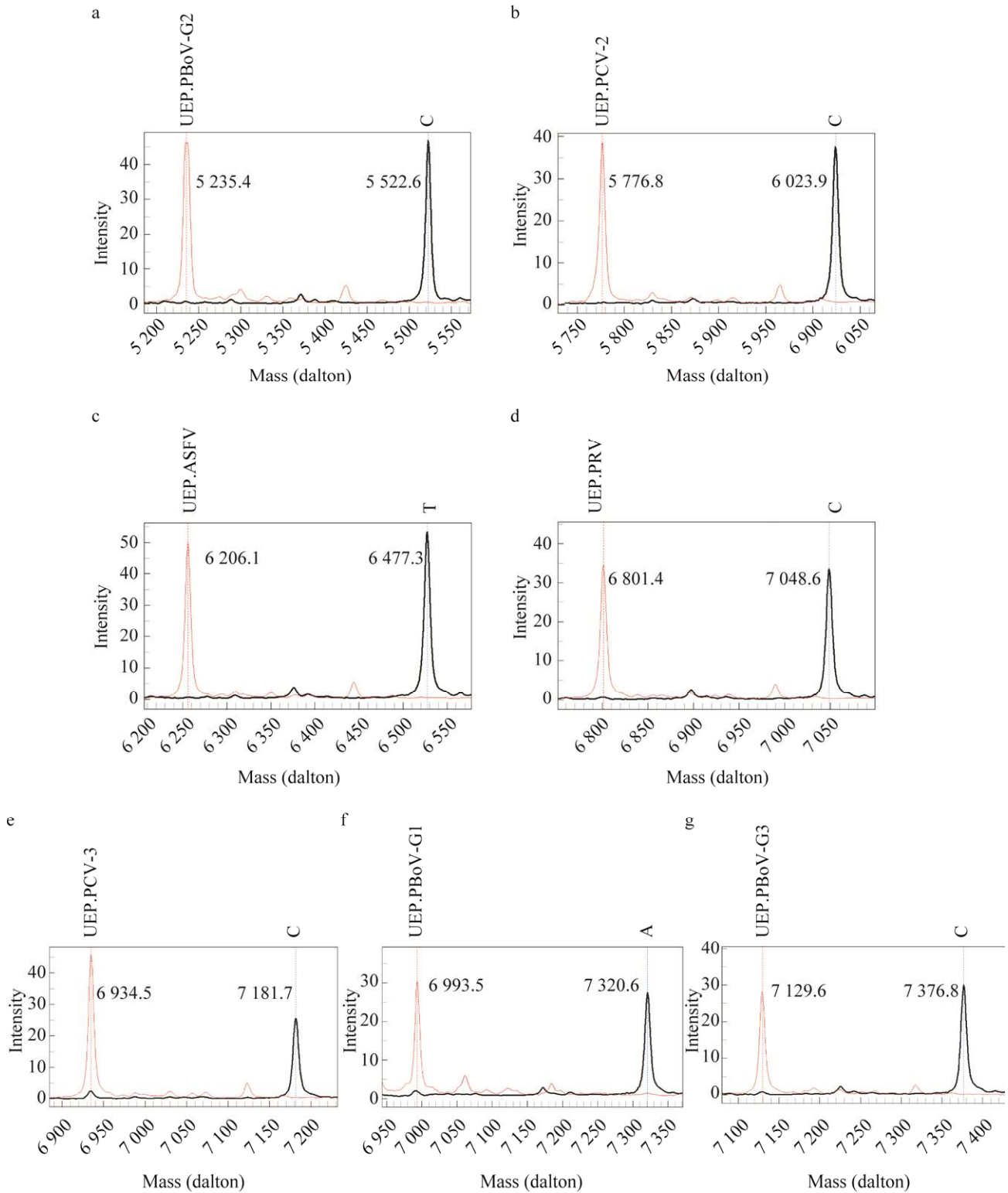


图 1 七种病毒单反应试验结果

Figure 1 Results of the single-reaction test for seven viruses. Red peak: ddH<sub>2</sub>O; Black peak: 10<sup>4</sup> copies/μL plasmid. a: PBoV-G2. b: PCV-2. c: ASFV. d: PRV. e: PCV-3. f: PBoV-G1. g: PBoV-G3.



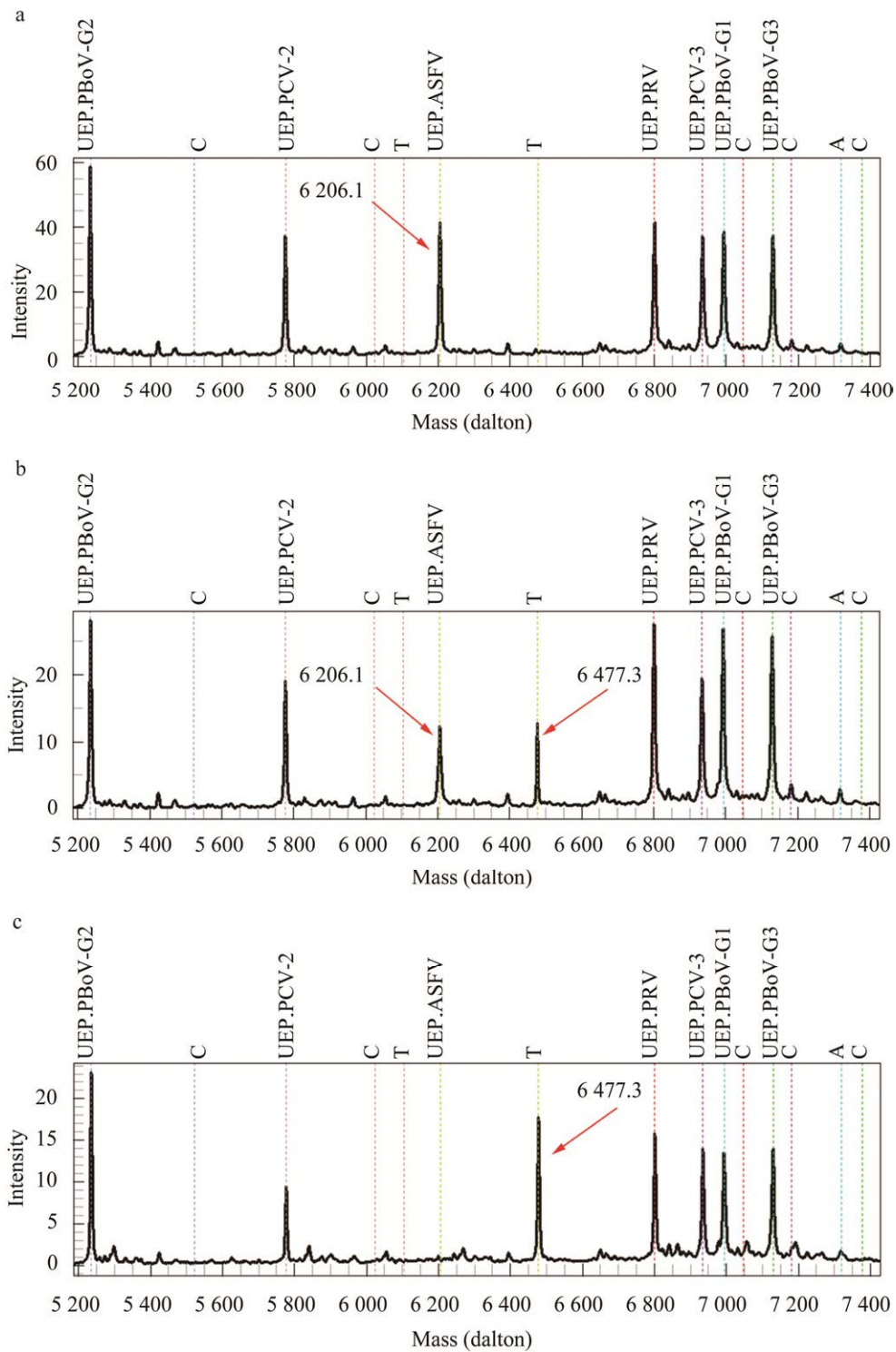


图 2 ddH<sub>2</sub>O、50、100 拷贝/μL ASFV 质粒作为模板的质谱结果对比

Figure 2 Comparison of mass spectrometry results of ddH<sub>2</sub>O, 50, and 100 copies/μL ASFV plasmid as template. a: ddH<sub>2</sub>O. b: 50 copies/μL plasmid. c: 100 copies/μL plasmid. The arrows are the corresponding peak positions of unextended extend probe (UEP) and extended mass probe of ASFV.

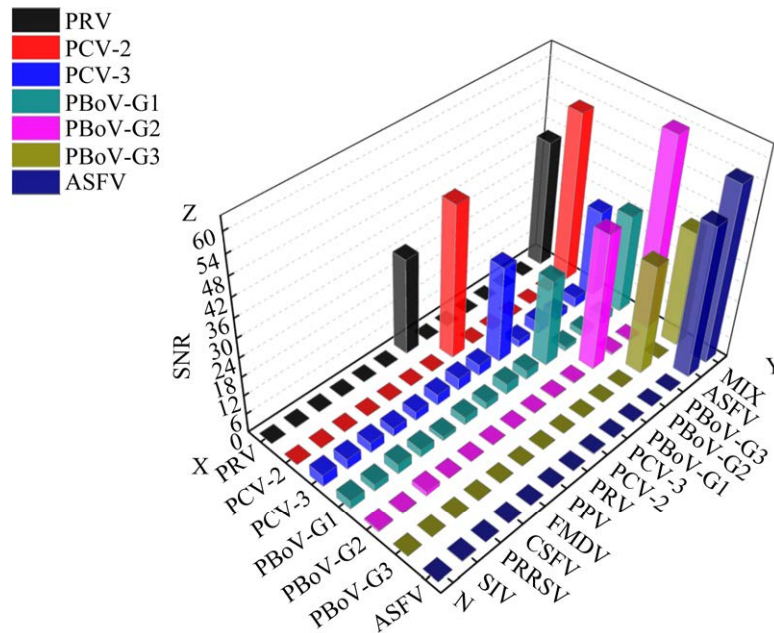


图3 7重核酸质谱体系特异性试验结果

Figure 3 7-plex nucleic acid mass spectrometry system specificity test results. X: 7 redetection system target; Y: ddH<sub>2</sub>O, each virus and 7 target mixed plasmid; Z: Signal to noise ratio (SNR).

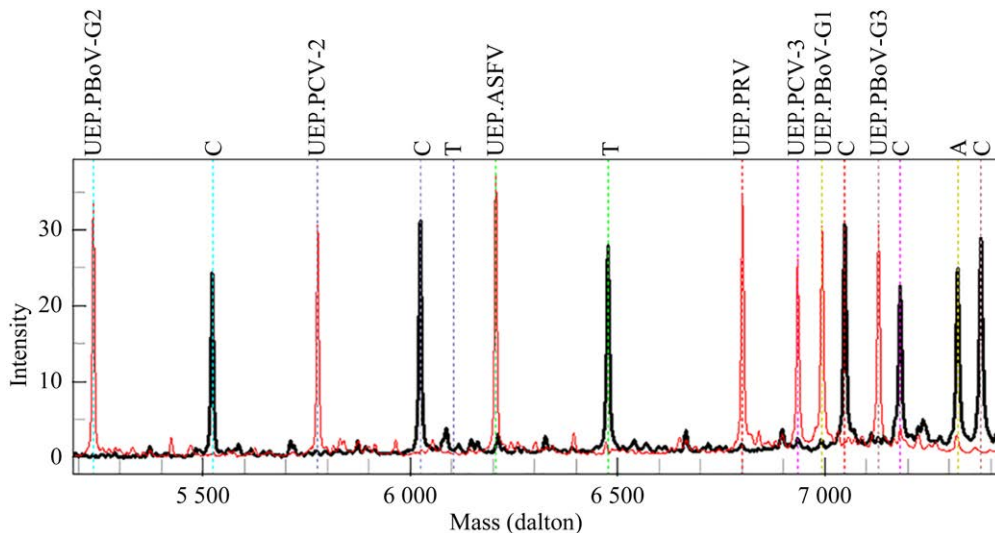


图4 混合质粒及空白对照的质谱结果合并图

Figure 4 Merged image of mass spectrometry results of mixed plasmids and blank controls. Red peak: ddH<sub>2</sub>O; Black peak: 10<sup>2</sup> copies/μL mixed plasmids of 7 targets.

## 2.5 重复性分析

以 10<sup>6</sup>、10<sup>4</sup>、10<sup>2</sup> 拷贝/μL 稀释度的混合质粒为模板对多重引物体系进行 50 组重复, 结果显示 10<sup>6</sup>、10<sup>4</sup> 拷贝/μL 水平组中 PRV、PCV-2、PCV-3、PBoV-G1、PBoV-G2、PBoV-G3 和 ASFV 的检测结果全部为阳性(SNR≥6), 10<sup>2</sup> 拷贝/μL 水

平组中除 PBoV-G3 阳性率为 98.0%, 其他阳性率均为 100%, 表明该方法重复性良好。3 个不同批次实验的检测结果中, PRV、PCV-2、PCV-3、PBoV-G2、PBoV-G3、和 ASFV 阳性率均为 100%, PBoV-G1 阳性率为 98.3%, 表明该法具有较高的批间重复性(表 2)。

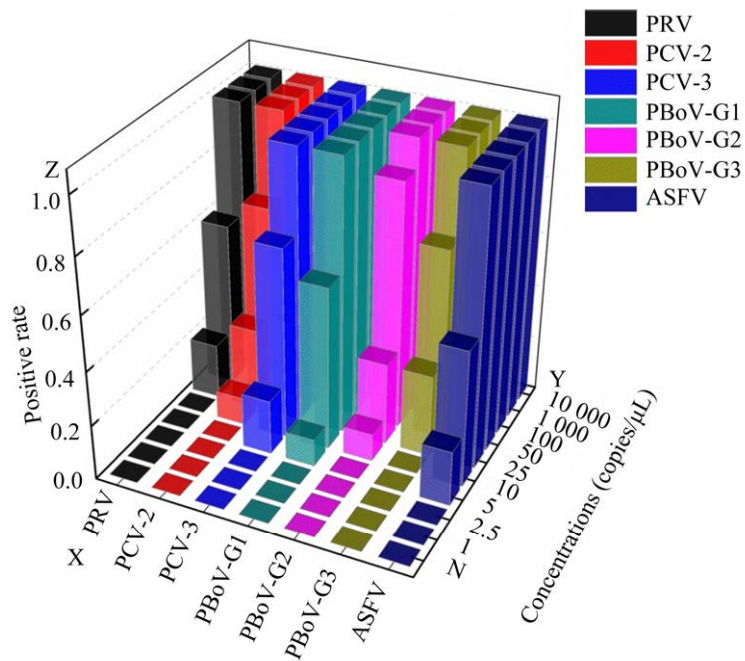


图 5 7重核酸质谱敏感性试验结果

Figure 5 7-plex nucleic acid mass spectrometry sensitivity test results. X: 7-plex system target; Y: Mixed plasmids of 7 targets with different concentrations, and ddH<sub>2</sub>O; Z: Proportion of positive results in 20 replicates.

表 2 重复性试验结果

Table 2 Results of repeatability test

Plasmid concentration (copies/μL)	Species	Intra-assay of variation	Inter-assay of variation
10 <sup>6</sup>	PRV	100.0% (50/50)	100.0% (60/60)
	PCV-2	100.0% (50/50)	100.0% (60/60)
	PCV-3	100.0% (50/50)	100.0% (60/60)
	PBoV-G1	100.0% (50/50)	100.0% (60/60)
	PBoV-G2	100.0% (50/50)	100.0% (60/60)
	PBoV-G3	100.0% (50/50)	100.0% (60/60)
	ASFV	100.0% (50/50)	100.0% (60/60)
10 <sup>4</sup>	PRV	100.0% (50/50)	100.0% (60/60)
	PCV-2	100.0% (50/50)	100.0% (60/60)
	PCV-3	100.0% (50/50)	100.0% (60/60)
	PBoV-G1	100.0% (50/50)	100.0% (60/60)
	PBoV-G2	100.0% (50/50)	100.0% (60/60)
	PBoV-G3	100.0% (50/50)	100.0% (60/60)
	ASFV	100.0% (50/50)	100.0% (60/60)
10 <sup>2</sup>	PRV	100.0% (50/50)	100.0% (60/60)
	PCV-2	100.0% (50/50)	100.0% (60/60)
	PCV-3	100.0% (50/50)	100.0% (60/60)
	PBoV-G1	100.0% (50/50)	98.3% (59/60)
	PBoV-G2	100.0% (50/50)	100.0% (60/60)
	PBoV-G3	98.0% (49/50)	100.0% (60/60)
	ASFV	100.0% (50/50)	100.0% (60/60)

## 2.6 样品检测应用

利用 MALDI-TOF MS 方法对 108 份组织、饲料、猪肉或人工污染样品进行检测, 结果如表 3 所示, 除 8 份人工污染样品外, 100 份样品中检出阳性的共计 64 份, 其中 2 种及以上混合感染样品 39 份。34 份组织样本中, 31 份样本能检出除 ASFV 外的 6 种病毒, 其中 23 份组织样本能检出 2 种及以上病毒的混合感染, 占比为 67.6%; 饲料样品中除 ASFV 和 PRV 外其余 5 种靶标均有检出, 42 份样品中检出阳性 18 份, 其中 2 种及以上病毒混合感染的样品 9 份 (21.4%); 在 24 份新鲜猪肉样品中检出 PCV-2 或 PCV-3 阳性共 15 份, 其中 2 种病毒混合感染样

品 7 份, 混合感染率为 29.2%。此外, 8 份不同浓度 ASFV-p72 假病毒人工污染的猪肉样品均可检出 ASFV 阳性, 与质粒标准品试验结果相符。

将 MALDI-TOF MS 体系的检测结果与荧光 PCR (组织、饲料、猪肉和人工污染样本) 检测结果进行比对验证, 7 种病毒靶标的阳性符合率、阴性符合率及总符合率分别为: PRV: 100%、100%、100%; PCV-2: 96.2%、92.9%、94.4%; PCV-3: 90.9%、98.5%、96.3%; PBoV-G1: 100%、98.9%、99.1%; PBoV-G2: 81.3%、100%、97.2%; PBoV-G3: 100%、100%、100% 和 ASFV: 100%、100%、100%, 两种方法检测结果基本相符 (表 4)。

表 3 108 份样品 MALDI-TOF MS 检测结果

Table 3 Results of MALDI-TOF MS detection of 108 samples

Samples	Target	Number	Number of mixed infection samples	Mixed infection rate
Tissues (34)	PCV-2	6	23	67.6% (23/34)
	PCV-3	1		
	PBoV-G1	1		
	PCV-2, PCV-3*	4		
	PCV-2, PBoV-G1*	1		
	PCV-2, PBoV-G2*	2		
	PCV-2, PCV-3, PBoV-G1*	8		
	PCV-2, PBoV-G1, PBoV-G2*	4		
	PCV-2, PCV-3, PBoV-G1, PBoV-G2*	1		
	PCV-2, PCV-3, PBoV-G1, PBoV-G2, PBoV-G3*	2		
	PRV, PCV-2, PCV-3, PBoV-G1, PBoV-G2*	1		
	N <sup>†</sup>	3		
	Feeds (42)	PCV-2		
PCV-2, PCV-3*		4		
PCV-2, PCV-3, PBoV-G1*		1		
PCV-2, PCV-3, PBoV-G3*		1		
PCV-2, PCV-3, PBoV-G1, PBoV-G2*		1		
PCV-2, PCV-3, PBoV-G1, PBoV-G2, PBoV-G3*		2		
N <sup>†</sup>		24		
Porks (24)	PCV-3	8	7	29.2% (7/24)
	PCV-2, PCV-3*	7		
	N <sup>†</sup>	9		
Artificially infected ASFV porks (8)		8	–	–
Total		108	39	–

\*: Multiple positive targets were detected in the same sample at the same time; †: No positive targets were detected in the sample; –: No result.

表 4 MALDI-TOF MS 多重检测体系与荧光 PCR 检测结果符合率

Table 4 Coincidence rate of detection by MALDI-TOF MS compared with qPCR

Target	Positive coincidence rate (%)	Negative coincidence rate (%)	Total coincidence rate (%)
PRV	100.0	100.0	100.0
PCV-2	96.2	92.9	94.4
PCV-3	90.9	98.5	96.3
PBoV-G1	100.0	98.9	99.1
PBoV-G2	81.3	100.0	97.2
PBoV-G3	100.0	100.0	100.0
ASFV	100.0	100.0	100.0

### 3 讨论与结论

我国养猪市场巨大, 据统计, 我国生猪养殖量占世界生猪总养殖量的 40%以上, 生猪饲养产值接近 1.3 万亿。随着生猪养殖业规模化和集约化程度的提高, 猪病混合感染的几率也随之增加。此外, 近年来由于猪博卡病毒、猪德尔塔冠状病毒等新发疫病在国内外流行范围的扩大以及非洲猪瘟等重大疫情的传播<sup>[14]</sup>, 加之部分病原体不同基因型病原体所引起的混合感染等, 使得疫病防控难度进一步增大。此时若使用多种单目标检测方法对样本逐一进行检测, 检测周期与成本都将大大增加, 开发多目标高通量检测方法, 提升检测诊断效率, 将为疾病防控提供更有力的保障。

目前动物疫病多重分子诊断技术主要包括多重 PCR 方法、多重 TaqMan 或 SYBR Green 荧光定量 PCR 方法、GeXP 多重 PCR 方法等<sup>[15]</sup>。多重 PCR 方法的敏感性及其特异性相较于荧光方法较低, 且退火温度容易受到扩增片段长度的影响; 多重荧光定量 PCR 的检测方法虽然具有高度的特异性和敏感性, 检测时间短, 但存在荧光通道的限制及多重引物间的交叉反应性, 极大限制了其同时检测四重及以上的靶标的能力; GeXP 多重 PCR 技术则由于毛细管电泳灵敏度过高, 可能造成检测结果假阳性<sup>[16]</sup>。而

MALDI-TOF MS 与多重 PCR 联用技术, 可使用质谱手段得到多个特异性核酸片段的质量信号, 从而对同一样本进行多靶点检测。通过对产物在 4 000–10 000 Da 的质量范围进行分析, 不但避开了多重 PCR 产物中的可能存在的引物二聚体及非特异性扩增产物, 同时在延伸阶段通过单碱基延伸进一步提高了检测体系的特异性, 在弥补了多重 PCR 缺陷的同时保持了质谱检测的灵敏度<sup>[17-18]</sup>。此外, 由于多重 PCR 与 MALDI-TOF MS 联用检测体系中引物及延伸探针干扰性较小, 使得体系具有很好的扩充性, 在更换部分引物及延伸探针的并优化引物浓度后, 可进一步增加用于检测的靶点, 以扩大检测体系所包含的病原体种类, 能够满足对多种类病原体快速、高通量检测的要求。

通过对本研究建立的 MALDI-TOF MS 体系进行方法学验证, 结果显示该方法稳定性与特异性好, 检测限与单重的荧光 PCR 相当。应用 MALDI-TOF MS 体系对总计 108 份样品进行检测, 其中 34 份组织及全血样品的混合感染率为 67.6% (23/34), 表明多种病毒性呼吸道疾病和繁殖障碍疾病病原体在患病猪只及猪群中造成的混合感染较为普遍, 其中以 PCV-2 混合感染最多, 高达 100%; PBoV-G1、G2、G3 三种基因型总检出率为 58.8% (20/34), 其中与别种病原体的混合感染占到 95.0% (19/20), 这与訾占超

等<sup>[19]</sup>对 PBoV 进行大规模检测的结果基本一致。24 份猪肉样品中检出 PCV-2、PCV-3 阳性 (29.2%、62.5%)，混合感染率为 29.2% (15/24)，提示当前猪肉市场中存在一定程度的猪圆环病毒污染。而含猪源成分饲料作为深加工制品，原本猪肉含量不高，并且存在部分病毒在加工处理阶段被清除的因素，42 份饲料样本中阳性检出率及混合感染率均最低，分别为 42.9% 和 21.4%。由此可见，在猪只养殖过程以及其产制品样本中均存在不同程度的病原体混合感染，且混合感染情况较为常见，进一步证明多目标高通量快速鉴别检测技术对于疫病的日常监测和鉴别诊断尤为重要。此外，MALDI-TOF MS 方法与荧光 PCR 方法对各靶标检测的结果基本相符，总符合率较高 (94.4%–100%)，而 MALDI-TOF MS 体系对样本检测的通量较荧光 PCR 更高，最多可同时上样 768 个，大大降低了时间成本和实际成本，可用于日常监测、疫情暴发或进出口快速检疫等场景下批量样本的规模化快速检测鉴定。

本研究通过核酸质谱 (MALDI-TOF MS) 技术建立了同步鉴定 PRV、PCV-2、PCV-3、PBoV-G1、PBoV-G2、PBoV-G3 和 ASFV 7 种猪呼吸道 DNA 病毒的多目标检测体系，具有高通量、高灵敏度、特异性强的特点，为猪群相关疫病监测和鉴别诊断以及进出口动物检疫提供了便利。

## 参考文献

- [1] 王颖然, 高利, 高翔, 肖建华. 2008–2018 年我国猪流行性腹泻病毒混合感染分析[J]. 中国动物传染病学报, 2020, 28(3): 97-103.  
WANG HR, GAO L, GAO X, XIAO JH. Analysis of mixed infections of porcine epidemic diarrhea virus with other pathogens from 2008 to 2018 in China[J]. Chinese Journal of Animal Infectious Diseases, 2020, 28(3): 97-103 (in Chinese).
- [2] 张丽, 罗玉子, 王涛, 孙元, 仇华吉. 非洲猪瘟诊断技术发展现状与需求分析[J]. 中国农业科技导报, 2019, 21(9): 1-11.  
ZHANG L, LUO YZ, WANG T, SUN Y, QIU HJ. Current progress and demand analysis of diagnostic technologies for African swine fever[J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2019, 21(9): 1-11 (in Chinese).
- [3] 中国核酸质谱应用专家共识协作组. 中国核酸质谱应用专家共识[J]. 中华医学杂志, 2018, 98(12): 895-900.  
Chinese Expert Consensus Group on the Application of MALDI-TOF MS. Chinese expert consensus on application of MALDI-TOF MS[J]. National Medical Journal of China, 2018, 98(12): 895-900 (in Chinese).
- [4] SINGHAL N, KUMAR M, KANAUIA PK, VIRDI JS. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 791.
- [5] CLARK AE, KALETA EJ, ARORA A, WOLK DM. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2013, 26(3): 547-603.
- [6] ZHANG C, XIU LS, XIAO Y, XIE ZD, REN LL, PENG JP. Simultaneous detection of key bacterial pathogens related to pneumonia and meningitis using multiplex PCR coupled with mass spectrometry[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2018, 8: 107.
- [7] TREMBIZKI E, SMITH H, LAHRA MM, CHEN M, DONOVAN B, FAIRLEY CK, GUY R, KALDOR J, REGAN D, WARD J, NISSEN MD, SLOOTS TP, WHILEY DM. High-throughput informative single nucleotide polymorphism-based typing of *Neisseria gonorrhoeae* using the Sequenom MassARRAY iPLEX platform[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2014, 69(6): 1526-1532.
- [8] 王立琴, 张驰, 李晓东, 彭俊平. MALDI-TOF MS 技术在传染病诊断中的应用进展[J]. 中国科学: 生命科学, 2022, 52.  
WANG LQ, ZHANG C, LI XD, PENG JP. Progress in applications of MALDI-TOF MS technology in the diagnosis of infectious diseases[J]. Scientia Sinica Vitae, 2022, 52 (in Chinese).
- [9] LIU TT, KANG L, LI YW, HUANG J, GUO ZS, XU JL, HU Y, ZHAI ZX, KANG XP, JIANG T, LI H, SONG HX, WANG J, GAO S, LI JX, ZHOU XG, YUAN Y, ZHAO BH, WANG JL, XIN WW.

- Simultaneous detection of seven human coronaviruses by multiplex PCR and MALDI-TOF MS[J]. *COVID*, 2021, 2(1): 5-17.
- [10] 刘宏钱, 宋朝晖, 梁巧米. 多重 RT-PCR MassARRAY 技术检测 27 种呼吸道病原体方法的建立和临床应用评价[J]. *检验医学*, 2021, 36(9): 939-946.  
LIU HQ, SONG CH, LIANG QM. Establishment and clinical application of multiple RT-PCR Mass ARRAY for the determinations of 27 respiratory pathogens[J]. *Laboratory Medicine*, 2021, 36(9): 939-946 (in Chinese).
- [11] LIU N, WANG L, CAI GZ, ZHANG DB, LIN JH. Establishment of a simultaneous detection method for ten duck viruses using MALDI-TOF mass spectrometry[J]. *Journal of Virological Methods*, 2019, 273: 113723.
- [12] JIANG YH, XIAO CT, YIN SH, GERBER PF, HALBUR PG, OPRIESSNIG T. High prevalence and genetic diversity of porcine bocaviruses in pigs in the USA, and identification of multiple novel porcine bocaviruses[J]. *The Journal of General Virology*, 2014, 95(Pt 2): 453-465.
- [13] 覃绍敏, 吴健敏, 马琳, 袁龙, 陈凤莲, 马玲, 白安斌. 猪博卡病毒全基因组序列分析与基因分型研究[J]. *中国预防兽医学报*, 2014, 36(2): 150-153.  
QIN SM, WU JM, MA L, YUAN L, CHEN FL, MA L, BAI AB. Analysis of complete genomic characterization and the genotyping classification of porcine Bocaviruses[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2014, 36(2): 150-153 (in Chinese).
- [14] 杨汉春, 周磊, 高元元, 白光焯. 2019 年猪病流行情况与 2020 年流行趋势及防控对策[J]. *猪业科学*, 2020, 37(2): 52-54.  
YANG HC, ZHOU L, GAO YY, BAI GY. Overview of swine diseases prevalence in 2019, epidemic tendency and control strategy in 2020[J]. *Swine Industry Science*, 2020, 37(2): 52-54 (in Chinese).
- [15] 官昭瑛, 李慧敏, 何曼文, 余展旺. 多重 PCR 技术在快速检测中的应用[J]. *山东化工*, 2021, 50(3): 85-88.  
GUAN ZY, LI HM, HE MW, YU ZW. Application of multiplex PCR technology in rapid detection[J]. *Shandong Chemical Industry*, 2021, 50(3): 85-88 (in Chinese).
- [16] 张平平, 王浩然, 郭兆彪, 杨瑞馥, 周蕾. 多重生物检测技术研究进展[J]. *军事医学*, 2012, 36(9): 713-717.  
ZHANG PP, WANG HR, GUO ZB, YANG RF, ZHOU L. Advances in research on multiple biological detecting technologies[J]. *Military Medical Sciences*, 2012, 36(9): 713-717 (in Chinese).
- [17] JURINKE C, OETH P, van den BOOM D. MALDI-TOF mass spectrometry[J]. *Molecular Biotechnology*, 2004, 26(2): 147-163.
- [18] DOELLINGER J, SCHROEDER K, WITT N, HEUNEMANN C, NITSCHKE A. Comparison of real-time PCR and MassTag PCR for the multiplex detection of highly pathogenic agents[J]. *Molecular and Cellular Probes*, 2012, 26(5): 177-181.
- [19] 訾占超, 夏应菊, 韩雪, 汪葆玥, 遇秀玲, 翟新验, 田克恭, 倪建强. 2009 年我国部分猪群输血传播病毒感染情况调查[J]. *中国预防兽医学报*, 2011, 33(10): 759-762.  
ZI ZC, XIA YJ, HAN X, WANG BY, YU XL, ZHAI XY, TIAN KG, NI JQ. Prevalence of Torque teno virus in China swine herds in 2009[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2011, 33(10): 759-762 (in Chinese).