



六种猪呼吸道 RNA 病毒 MALDI-TOF MS 同步检测体系的构建

张晓峰^{1,2}, 宋士琦³, 曾若雪¹, 陈吴健¹, 莫虹斐¹, 王正亮³, 帅江冰^{1,2*}

1 杭州海关技术中心, 浙江 杭州 311202

2 浙江省检验检疫科学技术研究院, 浙江 杭州 310016

3 中国计量大学生命科学学院, 浙江 杭州 310018

张晓峰, 宋士琦, 曾若雪, 陈吴健, 莫虹斐, 王正亮, 帅江冰. 六种猪呼吸道 RNA 病毒 MALDI-TOF MS 同步检测体系的构建[J]. 微生物学报, 2023, 63(9): 3653-3666.

ZHANG Xiaofeng, SONG Shiqi, ZENG Ruoxue, CHEN Wujian, MO Hongfei, WANG Zhengliang, SHUAI Jiangbing. A MALDI-TOF MS system for simultaneous detection of six RNA viruses causing porcine respiratory diseases[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(9): 3653-3666.

摘要:【目的】建立猪繁殖与呼吸综合征病毒(porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)、猪瘟病毒(classical swine fever virus, CSFV)、口蹄疫病毒(foot-and-mouth disease virus, FMDV)和猪流感病毒(swine influenza virus, SIV)的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)多目标检测方法,同时对 SIV 进行通用型、H1 型及 H3 型分型检测。【方法】本研究根据 6 种病原体基因的保守序列,设计了 6 对加标引物及对应的延伸探针并进行单反应试验。通过体系优化引物浓度和反应条件,以及方法特异性、重复性及灵敏度分析,使用 MALDI-TOF MS 检测方法及荧光定量 PCR 方法分别对临床样本和猪源产制品进行检测,并对结果进行对比验证。【结果】质谱结果显示,6 种产物峰仅在靶标病毒对应的产物位置出现峰值,其他常见猪病病原在质谱图像中均未出现干扰,表明该体系的特异性良好。体系中每种病毒在高、中、低浓度时的批内阳性符合率均为 100%,批间符合率均 $\geq 96.7\%$,表明该体系的重复性良好。灵敏度分析结果显示,体系中各病毒最低检测限在 6.73–21.25 拷贝/ μL 范围。应用 MALDI-TOF MS 多重检测方法对 124 份组织、饲料及猪肉样品进行检测,检出 PRRSV 阳性样本 9 份, SIV 阳性样本 3 份(其中 SIV-H1 阳性样

资助项目:浙江省重点研发计划(2021C02060);国家重点研发计划(2021YFF0602800);海关总署科技计划(2021HK159)
This work was supported by the Zhejiang Provincial Key Research and Development Program (2021C02060), the National Key Research and Development Program of China (2021YFF0602800), and the Scientific Research Projects of the General Administration of Customs (2021HK159).

*Corresponding author. E-mail: sjb@zaiq.org.cn

Received: 2023-01-31; Accepted: 2023-04-10; Published online: 2023-04-23

本 2 份, SIV-H3 阳性样本 1 份)。将以上结果与荧光定量 PCR 方法分析结果进行对比验证, 2 种方法对各病原体检测结果的总符合率可达到 99.2%–100%。【结论】本研究建立的 6 种猪呼吸道 RNA 病毒 MALDI-TOF MS 同步检测方法为相关疫病监测和快速鉴别, 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

A MALDI-TOF MS system for simultaneous detection of six RNA viruses causing porcine respiratory diseases

ZHANG Xiaofeng^{1,2}, SONG Shiqi³, ZENG Ruoxue¹, CHEN Wujian¹, MO Hongfei¹,
WANG Zhengliang³, SHUAI Jiangbing^{1,2*}

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

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

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

Abstract: [Objective] To establish a multi-target method based on matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) for the simultaneous detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), classical swine fever virus (CSFV), foot-and-mouth disease virus (FMDV), and swine influenza virus (SIV), and the detection of the general type, H1 type and H3 type of SIV. [Methods] We designed six pairs of primers and corresponding extension probes according to the conserved sequences of six pathogens and conducted single reaction tests. The primer concentrations and the reaction conditions were optimized for the established method. After examination of the specificity, repeatability, and sensitivity, the MALDI-TOF MS method was used to detect clinical samples and pig-derived products, and the results were compared with those obtained by fluorescence quantitative PCR. [Results] The established method only generated peaks corresponding to the positions of the target viruses, and other common pathogens causing swine diseases did not appear in the mass spectra, which indicated that the system had good specificity. The in-batch positive coincidence rate of each virus at high, medium, and low concentrations was 100%, and the inter-batch coincidence rate was $\geq 96.7\%$, indicating that the system had good repeatability. The minimum limit of detection for each virus in the system varied within 6.73–21.25 copies/ μL . We then used the MALDI-TOF MS method to detect 124 tissue, feed, and pork samples. A total of 12 positive samples were detected, including nine PRRSV positive samples and three SIV positive samples (two SIV-H1 positive samples and one SIV-H3 positive sample). We then compared the above results with the results from fluorescence quantitative PCR, and found that the total coincidence rate of the two methods for detection of each pathogen was 99.2%–100%. [Conclusion] A method for the simultaneous detection of six RNA viruses causing porcine respiratory diseases was established based on MALDI-TOF MS. This sensitive and specific high-throughput multi-target detection method

facilitates the surveillance and rapid identification of related diseases in 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

猪呼吸系统疾病致病源复杂, 常为病原体、外界环境或管理条件等多因素相互作用的结果^[1]。由于该症候群病原种类较多, 规模化养殖导致病毒传播速度快, 加之部分猪只感染后症状相似, 可能造成较大范围的混合感染。因此, 猪呼吸道症候群病原一直是现代养猪业规模化和集约化发展的制约因素之一, 其病原包括猪流感病毒(*swine influenza virus*, SIV)、猪繁殖与呼吸综合征病毒(*porcine reproductive and respiratory syndrome virus*, PRRSV)、猪瘟病毒(*classical swine fever virus*, CSFV)及口蹄疫病毒(*foot-and-mouth disease virus*, FMDV)等。PRRSV在猪只感染后, 多产生发热、呼吸困难和繁殖障碍等症状, 其与FMDV、CSFV一同被世界动物卫生组织列为法定报告传染病, 是各级政府动物防控相关单位长期重点监测的猪疫病, 对我国养猪业影响巨大, 且完全清除和控制难度较大。FMDV被列为我国一类动物疫病, 可引起偶蹄动物急性、热性和高度接触性疾病, 与SIV均为人畜共患病原。与FMDV不同, SIV对猪只的影响并不是最为严重的, 但鉴于猪只在流感病毒传播中扮演着“病毒混合器”的角色^[2], SIV的分型检测对预防猪只感染及流感病毒监测十分必要^[3]。病原的快速诊断是控制该疫病发生的前提, 因此建立高效的多病原体同时检测方法尤为重要。

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)技术是一种新型生物大分子检测技术, 可对一定质量范围的核酸、多肽及蛋白质等进行分析。通过对处理后的样本基质共结晶进行激光轰

击, 该方法可根据样品离子化后分子量差异, 得到关于样品内大分子的质量图谱^[4-6]。而MALDI-TOF MS与多重PCR反应联用作为一种核酸质谱技术, 其针对多重PCR扩增后的片段, 分别设计对应的延伸探针(*unextended extend probe*, UEP), 延伸探针与扩增产物以经虾碱性磷酸酶(*shrimp alkaline phosphatase*, SAP)消化后的双脱氧核苷三磷酸(*ddNTP*)为底物进行单碱基延伸反应后, 可使用质谱手段得到多组特异性核酸片段的质量信号, 从而完成对样本的多靶标检测。

MALDI-TOF 技术具备单核苷酸多态性(*single nucleotide polymorphism*, SNP)检测能力^[6], 在基因分型检测方面应用前景广阔, 现用于肿瘤易感基因检测、遗传病早筛及细菌耐药突变检测^[7-9]等。此外, MALDI-TOF 核酸质谱技术在病原微生物的检测方面已有较多研究, 如人呼吸道病毒、冠状病毒、性相关疾病病毒、乳头瘤病毒、疱疹及多瘤病毒和鸭症候群病毒检测^[10-17]等。本课题组前期针对7种猪呼吸道DNA病毒建立了MALDI-TOF MS检测方法^[18], 该方法稳定性与特异性良好, 每种病原体的检测限在8.65–26.27 拷贝/ μL 之间, 与单重荧光PCR检测方法性能相当。基于以上研究基础, 本研究对SIV、PRRSV、CSFV及FMDV等猪呼吸道症候群RNA病毒进行了多重引物及延伸探针的设计, 并对SIV目前主要流行和危害比较严重的H1、H3两个亚型^[19]进行分型检测, 建立了基于MALDI-TOF MS方法的6重常见猪呼吸道RNA病毒检测方法, 为猪只的批量检疫及猪源产制品的病毒检测提供了一种新手段。

1 材料与方 法

1.1 病毒

FMDV 灭活疫苗(OHM/02 株+AKT-111 株) 购自金宇生物技术股份有限公司。SIV-H1 灭活疫苗(TJ 株)购自武汉科前生物股份有限公司, SIV-H5、H7 灭活疫苗(Re-12 株+Re-3 株)购自青岛易邦生物工程有限公司。CSFV、PRRSV (HuN4 株)、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)及猪圆环病毒 2 型(porcine circovirus 2, PCV-2, JH SRJ 株)由浙江大学惠赠。猪细小病毒(porcine parvovirus, PPV) 由浙江农林大学惠赠。猪博卡病毒(porcine bocavirus, PBoV)核酸由本实验室保存。按 TaKaRa MiniBEST Viral RNA/DNA Extraction Kit 配套试剂说明书对毒株及疫苗进行核酸的提取纯化,并将 DNA 或反转录后的 cDNA 模板于 -20 °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、Premix Ex *Taq*™ 购自宝日

医生物技术(北京)有限公司; Equalbit® dsDNA HS Assay Kit 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; PCR Reagent Set、SAP Reagent Set、Iplex Pro Reagent Set 购自 Agena Bioscience 公司; 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和合成

下载 GenBank 收录的相关病毒基因序列, 使用 ClustalW 和 MEGA-X 进行多重序列对比, 最终选择 PRRSV 的 ORF6 基因、CSFV 的 5'-UTR 基因、FMDV 的 3D 基因、SIV 的 *MI* 基因、SIV-H1 与 SIV-H3 的 *HA* 基因保守区域作为目的片段。根据所选片段, 使用 Primer 3 及 MassARRAY Assay® 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, 并用 Primer-BLAST、MFEprimer 3.1 对所设计的多重引物及探针分别进行特异性、引物二聚体及发卡结构的评估。所选病毒目的基因、引物序列及质量信息见表 1。多重 PCR 引物及延伸探针,

表 1 CSFV、SIV、PRRSV、FMDV、SIV-H3 及 SIV-H1 目的基因及引物信息

Table 1 CSFV, SIV, PRRSV, FMDV, SIV-H3, and SIV-H1 target genes and primer information

Species	Target gene	Sequence of primer (5'→3')	Mass probe (5'→3')	Mass probe mass (Da)	Extended mass probe mass (Da)
CSFV	5'-UTR	F: ACGTTGGATGTACTCAGGACTTAGACCACC R: ACGTTGGATGCGAACTGGGCTAGCCATGC	AGGGAGCTCGCCACT	4 579.0	4 850.2
SIV	<i>MI</i>	F: ACGTTGGATGCGTCTACGCTGCAGTCCTCGC R: ACGTTGGATGGGCTAAAGACAAGACCAATC	CAGTCCTCGCTCACTG	4 794.1	5 081.3
PRRSV	ORF6	F: ACGTTGGATGTAACCACGCATTTGTCGTCC R: ACGTTGGATGCCACCCAACACGAGGCTTTT	CCACTACGGTCAACGGCA	5 454.6	5 701.7
FMDV	<i>3D</i>	F: ACGTTGGATGCAGGAGAAGTTGATCTCCG R: ACGTTGGATGGATCTGTAGCTTGGAAATCTC	AGTTGATCTCCGTGGCAG	5 531.6	5 818.8
SIV-H3	<i>HA</i>	F: ACGTTGGATGATGGCAAAGGAAATCCATAG R: ACGTTGGATGTGACCATGATGTATACAGAG	GGATCCAATCTTTGTATCCT	6 059.0	6 346.2
SIV-H1	<i>HA</i>	F: ACGTTGGATGCATTAGAACACATCCAGAA R: ACGTTGGATGACCAGATTTGGCGATCTA	GGATGGCCCCCAGGGAGACT	6 169.0	6 440.2

用于对比验证的荧光定量 PCR 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。

1.4 标准质粒的建立

以 GenBank 中公布的 CSFV (NC_002657.1)、PRRSV (AF066183.4)、FMDV (AY593823.1)、SIV (U53169.1)、SIV-H1 (JN809161) 和 SIV-H3 (NC_007366.1) 基因序列为模板, 参照病毒目的片段选取相应位置, 由生工生物工程(上海)股份有限公司构建 pUC-57 标准质粒。使用 Qubit 4 测得每一质粒浓度, 根据 $(N_A \times \text{质粒浓度}) / (\text{碱基数} \times 660 \text{ Da/bp}) = \text{copies/mL}$, 其中 $N_A = 6.02 \times 10^{23}$, 进一步得到各质粒拷贝数: 6.09×10^9 拷贝/ μL (CSFV)、 1.24×10^{10} 拷贝/ μL (PRRSV)、 9.56×10^9 拷贝/ μL (FMDV)、 1.48×10^{10} 拷贝/ μL (SIV)、 8.29×10^9 拷贝/ μL (SIV-H1) 和 4.12×10^9 拷贝/ μL (SIV-H3), 按 10 倍梯度稀释成 10^9 – 10^0 拷贝/ μL 共 10 个梯度, 将同一浓度水平的 6 种质粒等体积混合, 得到各梯度的混合标准质粒, 置于 -20°C 保存备用。

1.5 单重反应试验

反应体系中仅加入该靶标的扩增引物及延伸探针, 以 1.4 中每种中浓度质粒 (10^4 拷贝/ μL) 为模板, 设置 ddH₂O 为空白对照, 对 6 种靶标分别进行单靶标扩增试验, 通过质谱结果来验证每组靶标扩增引物及延伸探针的反应状况。

1.6 多重体系反应条件及优化

MALDI-TOF MS 与 PCR 联用方法主要通过对本样本 DNA 或 cDNA 进行多重 PCR 反应、SAP 消化反应以及单碱基延伸反应, 延伸产物再通过质谱仪进行检测与分析。(1) 反转录反应: 将 2 μL 模板 RNA 与 4 μL 5 \times PrimeScript IV cDNA Synthesis Mix、2 μL Random 6 mers 混合, 用 ddH₂O 补至 20 μL , 反应程序为 30°C 10 min; 42°C 15 min。(2) 多重 PCR 反应: 将 2 μL 质粒或反转录后的 cDNA 模板与 1.2 μL PCR Buffer

Mix、1 μL PCR 引物混合液一并混合, 用 ddH₂O 补至 5 μL , 反应程序为 95°C 2 min; 95°C 15 s, 60°C 30 s, 72°C 60 s, 进行 35 个循环; 72°C 5 min。(3) SAP 消化反应: 将扩增产物加入 2 μL SAP 酶混合液, 反应程序为 37°C 40 min; 85°C 5 min。(4) 延伸反应: 将消化产物中加入 1 μL 延伸探针混合液, 0.2 μL Inplex buffer 及 0.2 μL Termination mix, 用 ddH₂O 补至 9 μL 。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; 72°C 3 min。将反应结束后的延伸产物, 转至 384 板, 用 ddH₂O 补至 25 μL , 8 000 r/min 离心 2 min。将离心后的 384 孔板及其配套芯片放入质谱仪, 完成样本设置及芯片编板后进行质谱飞行参数设置。启动点样状态默认设置(400), 纯化树脂进样量为 10 μL , 激光发射器的激光脉冲设置为 30 次, 每个样本数据最大采集次数设置为 9 次。使用 MassARRAY Typer 软件对质谱信号进行处理及分析。

根据延伸效率 $E = S_{\text{产物峰}} / (S_{\text{UPE 残留峰}} + S_{\text{产物峰}})$, 以 $E \geq 0.8$ 为标准, 同时考虑多重延伸探针的相对峰高, 分别对体系中多重引物和延伸探针比例进行调整。以 10^4 拷贝/ μL 混合质粒为模板, 使用初始浓度分别为 0.5、5 $\mu\text{mol/L}$ 的引物与延伸探针, 对多重体系进行优化, 以获得具有清晰延伸探针峰及产物峰的质量信号谱图。

1.7 特异性试验

以 PCV-2、PEDV、PBoV、PPV 和 PRV 等非靶标的常见猪病病毒基因组核酸, 以及 SIV-H1、SIV-H3、SIV-H5/H7、PRRSV、CSFV 和 FMDV 这些靶标基因组核酸为模板, 以 10^2 拷贝/ μL 标准质粒混合模板为阳性对照, ddH₂O 为阴性对照, 进行 MALDI-TOF MS 多重检测体系的特异性试验。若各非靶标病原体无延伸产物峰, 而 SIV、SIV-H1、SIV-H3、PRRSV、

CSFV、FMDV 及混合质粒有延伸产物峰出现在特定位置,且产物峰之间无重叠,则认为检测体系特异性良好。

1.8 敏感性试验

为评价该方法的灵敏度,使用优化后的反应体系对混合质粒进行实验。将 10^4 、 10^3 、 10^2 、50、25、10、5、2.5、1 拷贝/ μL 的混合标准质粒作为模板,以优化后的 MALDI-TOF MS 检测体系对每组梯度进行 10 次重复,每次重复均为阳性时体系中质粒标准品的浓度被认为是 MALDI-TOF MS 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、低浓度(10^6 、 10^4 、 10^2 拷贝/ μL)的混合质粒标准品为模板,每组稀释度设置 20 个重复进行实验,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 个不同时间分别进行检测,每个浓度设置 10 个重复,记录 3 批独立实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 份组织样本、42 份含猪源性成分饲料样品和 48 份新鲜猪肉样品由本实验室收集保存。分别取 0.5 g 组织或新鲜猪肉、饲料样品,经低温研磨后按质量体积比 1:10 置于磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)中,振荡混匀后 10 000 r/min 离心 5 min,取上清进行核酸提取。按核酸提取仪 NP968-C 配套试剂说明书对样品进行总 RNA 提取,使用 PrimeScript™ IV 1st strand cDNA Synthesis Mix 对所得核酸进行反转录,并将得到的 cDNA 用于 MADLI-TOF MS 方法及荧光定量 PCR 方法的检测。荧光定量 PCR 方法为 PRRSV^[20]、CSFV^[21]、FMDV^[22]、SIV^[23]、SIV-H1 及 SIV-H3^[24]六种病毒单靶标检测,将 2

种方法所得结果按照(真阳性数+真阴性数)/检测总数 $\times 100\%$,进行总符合率的计算,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/ μL 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,可分别得到每个靶标以质量(mass)为横坐标、信号强度(intensity)为纵坐标的质谱图像。如图 1 所示,体系中每种病毒均仅有延伸产物单峰(CSFV: 4 850.2 Da, SIV: 5 081.3 Da, PRRSV: 5 701.7 Da, FMDV: 5 818.8 Da, SIV-H3: 6 346.2 Da, SIV-H1: 6 440.2 Da),其对应的阴性对照仅有延伸探针峰单峰(CSFV: 4 579.0 Da, SIV: 4 794.1 Da, PRRSV: 5 454.6 Da, FMDV: 5 531.6 Da, SIV-H3: 6 059.0 Da, SIV-H1: 6 169.0 Da),质谱图像清晰且质量检测范围内并未出现杂峰,表明该体系中每种病毒的扩增引物及质量探针均可有效反应。

2.2 反应体系的建立

如图 2 所示,体系中每种病毒在质谱图像中对应延伸探针(UEP)和单碱基延伸产物 2 个峰位置,检测结果中质谱图像若仅在延伸探针处存在峰值,表示该种靶标检测结果为阴性,此时延伸探针未参与反应;若在延伸产物处出现峰值(SNR ≥ 6),则表示该靶标检测结果为阳性。体系中每组引物及延伸探针的浓度经过优化后,最终采用的多重 PCR 引物分别为 0.6 $\mu\text{mol/L}$ (SIV)、0.5 $\mu\text{mol/L}$ (SIV-H1)、0.5 $\mu\text{mol/L}$ (SIV-H3)、0.3 $\mu\text{mol/L}$ (PRRSV)、0.5 $\mu\text{mol/L}$ (CSFV)、0.6 $\mu\text{mol/L}$ (FMDV),延伸探针的最佳浓度分别为 6 $\mu\text{mol/L}$ (SIV)、5 $\mu\text{mol/L}$ (SIV-H1)、5 $\mu\text{mol/L}$ (SIV-H3)、5 $\mu\text{mol/L}$ (PRRSV)、3.5 $\mu\text{mol/L}$ (CSFV)、5 $\mu\text{mol/L}$ (FMDV)。

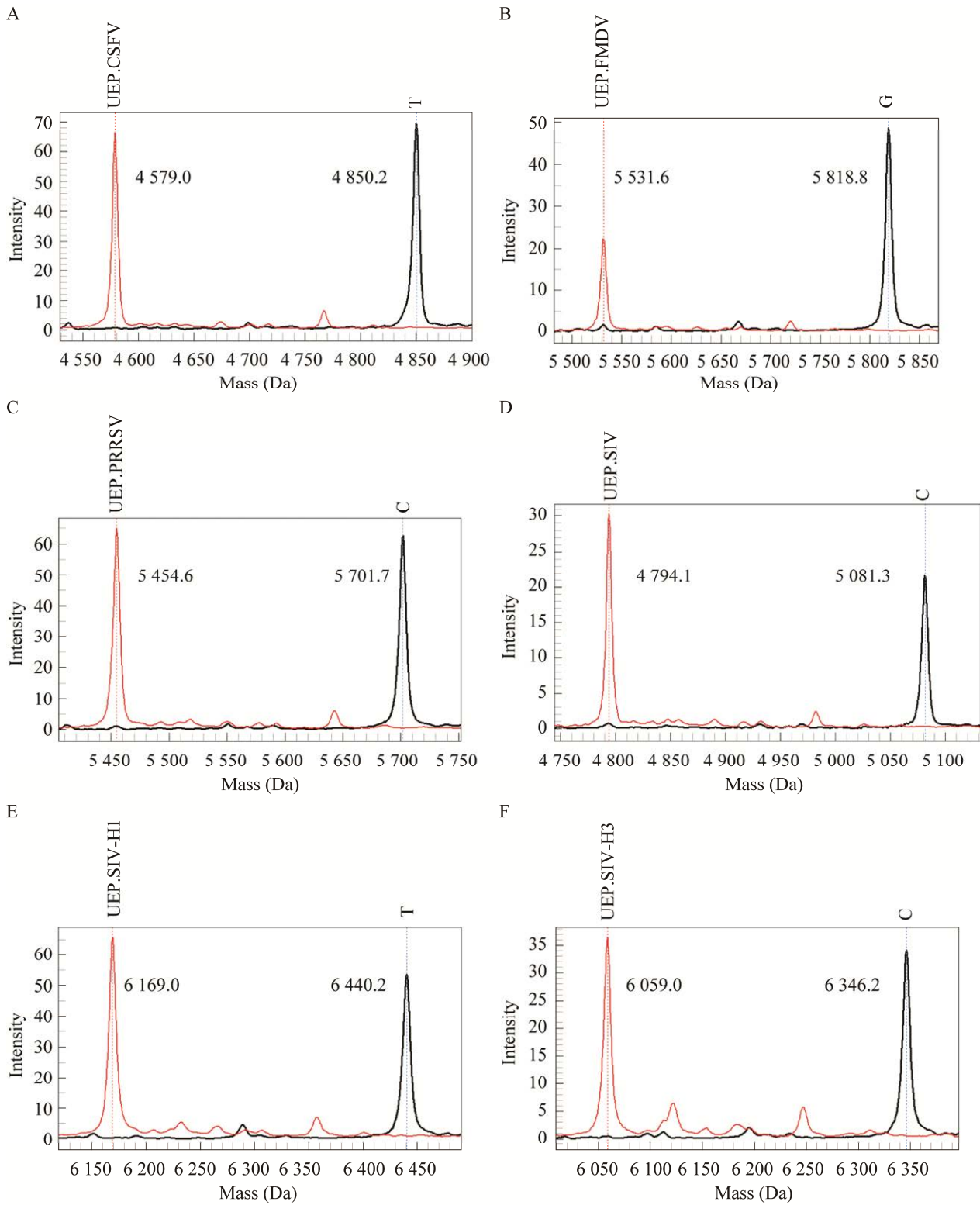


图 1 六种病毒单反应试验结果

Figure 1 Results of the single-reaction test for six viruses. Red peak: ddH₂O as template; Black peak: 10⁴ copies/μL plasmid as template. A: CSFV. B: FMDV. C: PRRSV. D: SIV. E: SIV-H1. F: SIV-H3.

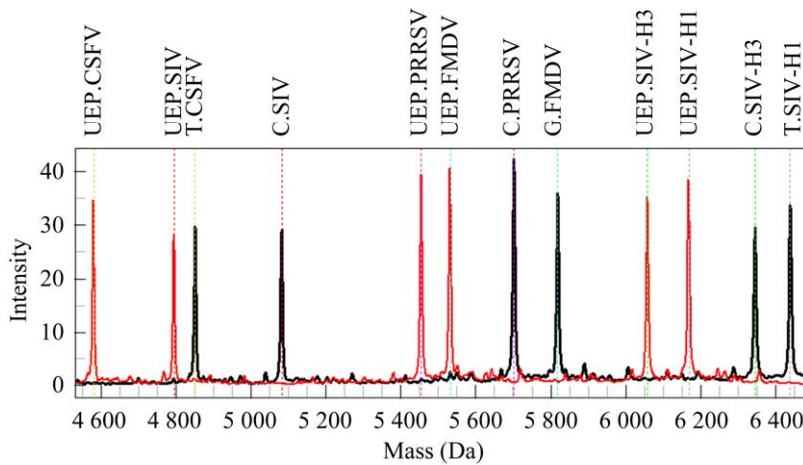


图 2 混合质粒及空白对照的质谱结果合并图

Figure 2 Merged image of mass spectrometry results of mixed plasmids and blank controls. Red peak: ddH₂O as template; Black peak: 10² copies/μL mixed plasmids of six targets.

2.3 特异性分析

分别以 SIV-H1、SIV-H3、SIV-H5/H7、PRRSV、CSFV、FMDV 等靶标病毒 cDNA，以及 PCV-2、PEDV、PBoV、PPV 和 PRV 等非靶标常见猪病病毒 DNA 或 cDNA 为模板，经 MALDI-TOF MS 检测后的实验结果如图 3 所示。结果显示，体系中每种靶标病毒在各自延伸产物处均分别产生单峰(SNR≥6)，非靶标模板只存在延伸探针峰，而在延伸产物处均无峰(SNR≤3)，且阴性对照及阳性对照成立。其中 SIV-H1、SIV-H3 在其自身及 SIV 的延伸产物处均存在产物峰，而 SIV-H5/H7 仅在 SIV 通用型位置产生阳性，在 SIV-H1、SIV-H3 位置无产物峰及干扰峰(图 4)，与实验预期相符。结果表明，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，具有良好的特异性。

2.4 敏感性分析和最低检测限

为评价检测体系的敏感性，根据优化后的引物及 UEP 浓度对 10⁴–10⁰ 拷贝/μL 的混合质粒模板进行 MALDI-TOF MS 实验。根据 10 次重复均为阳性的质粒浓度，可得到每种病毒的最低检测限：CSFV 6.76 拷贝/μL、SIV 8.22 拷贝/μL、

PRRSV 13.73 拷贝/μL、FMDV 21.25 拷贝/μL、SIV-H3 9.15 拷贝/μL 和 SIV-H1 18.41 拷贝/μL (图 5)，体系中每种靶标的检测浓度均小于 25 拷贝/μL，其中 CSFV、SIV 的检测水平可达单拷贝，表明体系的敏感性较好。

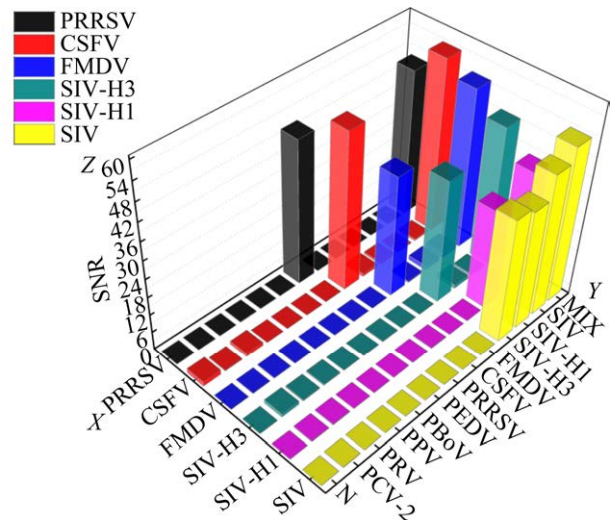


图 3 六重核酸质谱体系特异性试验结果

Figure 3 Six-plex nucleic acid mass spectrometry system specificity test results. X: Six redetection system target; Y: ddH₂O, each virus and six target mixed plasmid; Z: Signal to noise ratio (SNR).

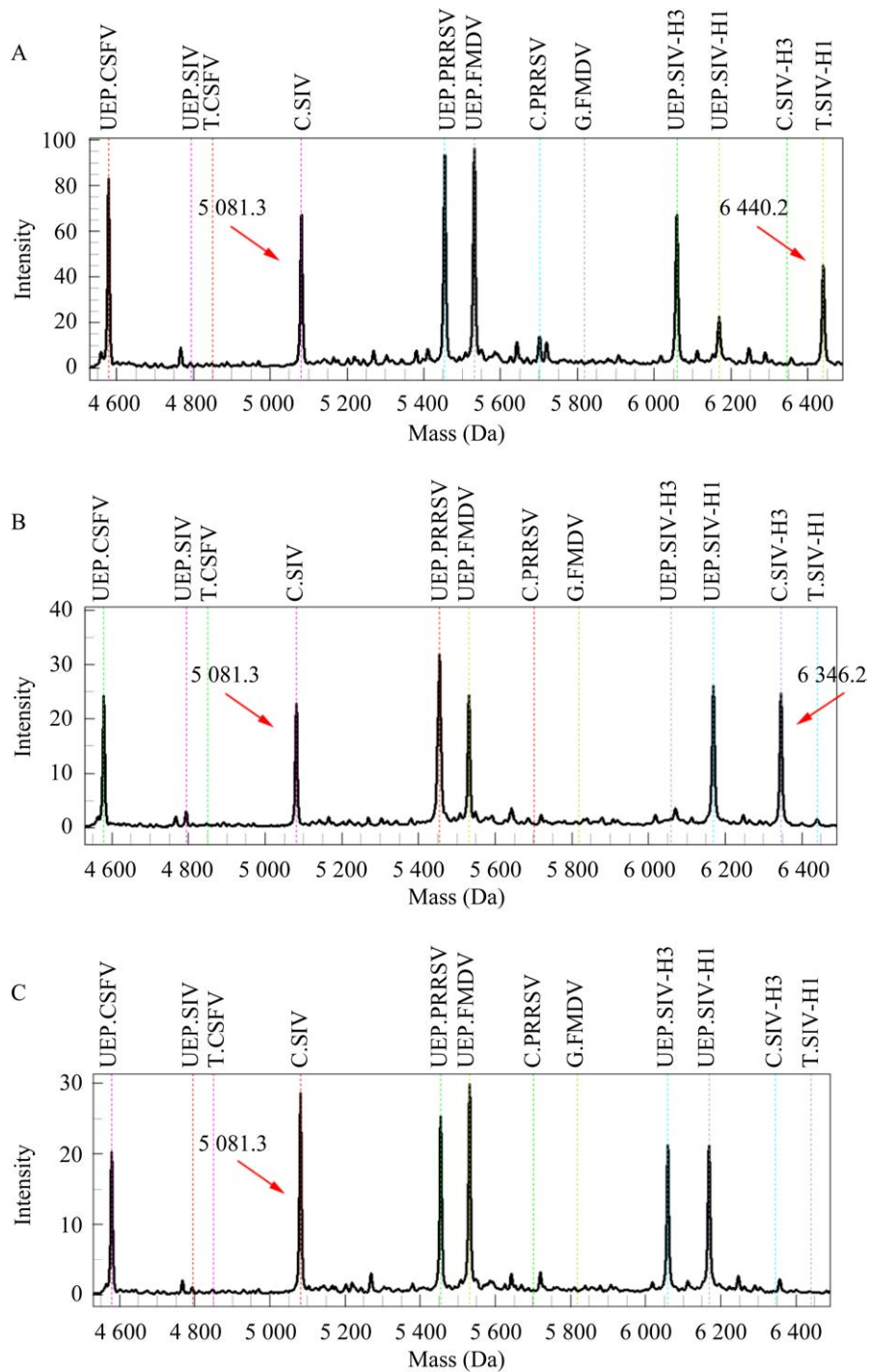


图 4 SIV-H1、SIV-H3 及 SIV 特异性试验结果

Figure 4 Sensitivity test results of SIV-H1, SIV-H3 and SIV. A: Using SIV-H1 nucleic acid as the template, the red arrow indicates that SIV (5 081.3 Da) and SIV-H1 (6 440.2 Da) are positive. B: Using SIV-H3 nucleic acid as template, the red arrow indicates that SIV (5 081.3 Da) and SIV-H3 (6 346.2 Da) are positive. C: Using SIV-H5 and SIV-H7 nucleic acid as template, the red arrow is only positive for SIV (5 081.3 Da).

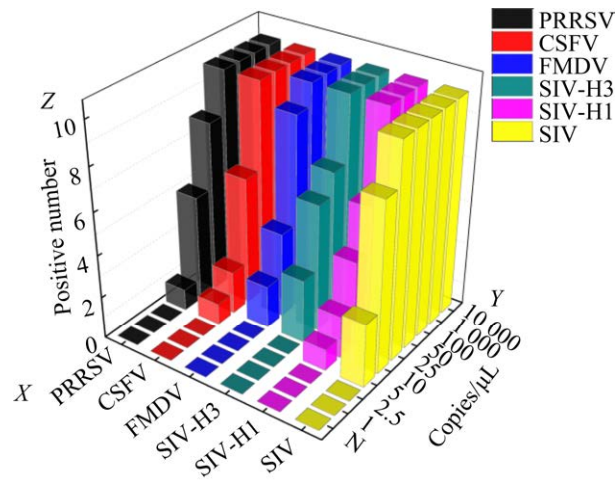


图5 六重核酸质谱敏感性试验结果

Figure 5 Six-plex nucleic acid mass spectrometry sensitivity test results. X: Six-plex system target; Y: Mixed plasmids of six targets with different concentrations; Z: The number of positive results in ten replicates.

2.5 重复性分析

为验证体系对不同浓度下混合质粒的重复

性, 以 10^6 、 10^4 、 10^2 拷贝/ μL 三种浓度为代表, 将对应混合质粒作为模板各进行 20 组重复; 此外, 于 3 个时间段分别进行检测, 每个浓度重复 10 次。结果如表 2 所示, 高、中、低浓度组(10^6 、 10^4 、 10^2 拷贝/ μL)中 SIV、SIV-H1、SIV-H3、PRRSV、CSFV 及 FMDV 六种靶标的检测结果全部为阳性($\text{SNR} \geq 6$), 表明该方法批内重复性良好。3 个不同批次实验的检测结果中, SIV、SIV-H3、PRRSV、FMDV 及 CSFV 阳性率均为 100%, SIV-H1 阳性率为 96.7% (29/30), 表明该方法具有较高的批间重复性(表 2)。

2.6 样品检测应用

利用 MALDI-TOF MS 方法对 34 份组织或全血样品、42 份含猪源性成分饲料样品、48 份猪肉样品进行检测。结果如表 3 所示, 124 份样品中检出阳性样品共计 16 份, 均为组织样本检出。34 份组织样本中, PRRSV 检出 9 份, SIV 检出共 3 份, 其中 SIV-H1、SIV-H3 分别检出 2 份

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 (%)
10^6	SIV	100.0 (20/20)	100.0 (30/30)
	SIV-H1	100.0 (20/20)	100.0 (30/30)
	SIV-H3	100.0 (20/20)	100.0 (30/30)
	PRRSV	100.0 (20/20)	100.0 (30/30)
	CSFV	100.0 (20/20)	100.0 (30/30)
	FMDV	100.0 (20/20)	100.0 (30/30)
10^4	SIV	100.0 (20/20)	100.0 (30/30)
	SIV-H1	100.0 (20/20)	100.0 (30/30)
	SIV-H3	100.0 (20/20)	100.0 (30/30)
	PRRSV	100.0 (20/20)	100.0 (30/30)
	CSFV	100.0 (20/20)	100.0 (30/30)
	FMDV	100.0 (20/20)	100.0 (30/30)
10^2	SIV	100.0 (20/20)	100.0 (30/30)
	SIV-H1	100.0 (20/20)	96.7 (29/30)
	SIV-H3	100.0 (20/20)	100.0 (30/30)
	PRRSV	100.0 (20/20)	100.0 (30/30)
	CSFV	100.0 (20/20)	100.0 (30/30)
	FMDV	100.0 (20/20)	100.0 (30/30)

表 3 MALDI-TOF MS 多重检测体系与荧光 PCR 检测结果及总符合率

Table 3 Results and coincidence rate of detection by MALDI-TOF MS compared with qPCR

Target	Positive number [†]		Total coincidence rate (%)
	MALDI-TOF MS	qPCR	
PRRSV	9/0/0	9/0/0	100.0 (124/124)
FMDV	0/0/0	0/0/0	100.0 (124/124)
CSFV	0/0/0	0/0/0	100.0 (124/124)
SIV-H1	2/0/0	1/0/0	99.2 (123/124)
SIV-H3	1/0/0	1/0/0	100.0 (124/124)
SIV	3/0/0	3/0/0	100.0 (124/124)

[†]: Tissue, pork and feed samples tested by two methods.

和 1 份。42 份饲料样品及 48 份新鲜猪肉样品中 6 种靶标病毒均未检出。使用 MALDI-TOF MS 方法与 PRRSV、CSFV、FMDV、SIV、SIV-H1、SIV-H3 荧光定量 PCR 方法的检测结果进行对比。结果显示, 2 种方法的阳性检出结果基本一致, 除 SIV-H1 符合率为 99.2% 外, 其余 5 种靶标符合率均为 100%。

3 讨论与结论

中国是世界猪肉最大生产国与消费国, 2022 年国内猪肉生产量占到世界总产量的 44.5%, 而根据 2022 年国内肉类消费结构统计显示, 在所有肉类消费中猪肉占到 77.7%。近年来, 随着生猪养殖业不断发展, 猪病带来的危害也愈发明显。猪呼吸与繁殖综合征、腹泻综合征等不同症候群病原导致的病毒病限制了养猪业及猪肉交易市场的进一步发展, 其中一些人畜共患病原体也对公众的健康造成危害。例如流感病毒, 截至目前 SIV 可按照血凝素(hemagglutinin, HA)及神经氨酸酶(neuraminidase, NA)分为 H1-H18、N1-N11 等亚型, 经过基因重排后存在多种病毒亚型, 而猪体内同时存在唾液酸-2,3-半乳糖苷与唾液酸-2,6-半乳糖苷 2 种流感病毒的特异性受体, 不同亚型的流感病毒在猪体内可通过重组与适应, 致使猪只存在感染禽流感(SIV-H5、H7 和 H9)及人流感(SIV-H1、H2 和 H3)的风险^[25]。此

外, 国外进口猪只及其产制品也可能携带病原体, 如 2018-2019 年间传入的非洲猪瘟病毒(African swine fever virus, ASFV)。作为一种致死率极高的烈性传染病, ASFV 目前尚无批准上市的商品化疫苗, 口岸防御与检疫仍是防止该类疫情传入国内的首要方式^[26]。由此可见, 针对重点病原建立和完善多重病原体检测体系十分必要。

目前动物疫病病原检测方法主要包括基于血清学的酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)、免疫酶和免疫荧光, 及血凝试验等传统方法, 基于分子生物学检测的 PCR、荧光定量 PCR、数字 PCR、二代测序, 以及液相芯片、核酸质谱等技术。传统血清学方法技术最为成熟, 但对于试验结果的评价可能存在主观性, 且较难达到短时间内多种病原体同时检测的要求。以 PCR 为代表的低通量检测技术, 灵敏度高且操作简易; 尤其数字 PCR 作为绝对定量技术, 能够很好地对复杂基质中微量靶标进行检测, 但其成本偏高, 在实际应用时可能存在同时检测靶标少、荧光串扰等局限。二代测序(next-generation sequencing, NGS)技术可对包含未知病原的样本进行高通量检测, 但操作较为复杂, 以及建库等因素导致重复性不佳; 三代测序(third generation sequencing, TGS)技术自身测序深度不高, 且错误率与 NGS 相比较, 检测成本仍高于前几种方法, 难以应用于进出境等

大样本检测的场景。此外,用于多种病原体检测的多重 PCR 技术,保留了以 PCR 技术灵敏度高、成本低的优势,但在应用时往往受限于体系中多组引物间产生的二聚体、发夹结构等交叉反应,或荧光染料及探针荧光通道的限制,通常难以对 4 种及以上靶标进行同时检测。而 MALDI-TOF MS 与多重 PCR 联用技术在设计多重引物时,采用同源加尾(homo-tag assisted non-dimer, HAND)^[27]策略,将每条 PCR 引物的 5'端加入相同的质量标签(5'-ACGTTGGATG-3'),能够有效减少引物二聚体的形成,同时避免少量二聚体及未反应引物对质谱中质量探针峰及产物峰位置的干扰,从而对多种病原体靶点进行同时检测。MALDI-TOF MS 与多重 PCR 联用技术使用质谱手段,可同时对近 6 000 Da 质量范围的核酸片段进行检测,在面对多种靶标的中高通量检测项目时有较大的成本优势,适用于临床及进出口口岸情境下不同症候群动物疫病重要病原体的监测。

通过方法学验证,该 RNA 病毒检测方法具有较好的稳定性与特异性,体系中的每个靶标检测限均可达 10^1 拷贝/ μL 水平,与单重的荧光 PCR 相当。通过对组织及全血样本、饲料样本及新鲜猪肉样本进行检测,结果表明 MALDI-TOF MS 方法与荧光定量 PCR 方法对本检测结果的符合率较高(99.2%–100%),这与前期本课题组建立的猪呼吸道 DNA 病毒 MALDI-TOF MS 检测方法 with qPCR 方法的比对结果一致^[18]。在本研究中,2 种方法均在样品中检出了 9 份 PRRSV 阳性样本、3 份 SIV 阳性样本(包括 SIV-H3 阳性样本 1 份),而 CSFV、FMDV 均为阴性。2 种方法的差异主要体现在对组织样本中 SIV-H1 的检测结果上:1 份组织样本经 MALDI-TOF MS 方法检测,显示其 SIV、SIV-H1 均为阳性;荧光定量 PCR 方法结果显示该样本 SIV-H1 为阴性(C_t 值 ≥ 38),而 SIV 为阳性,提示

该样本 SIV-H1 结果为假阴性。后期经测序确认,该样本确为 SIV-H1 阳性样本。此外,2 种方法在 42 份饲料及新鲜猪肉样品中均未检出阳性,这可能是由于饲料中猪源成分在深加工及后续保藏过程中对病毒结构破坏较为严重,使得样品中病毒 RNA 片段的含量较低(≤ 25 拷贝/ μL);或饲料所使用猪源成分可能未受到几种病毒的污染,对 48 份新鲜猪肉样品全部为阴性的结果也支持这一推测。

本研究首次建立了基于 MALDI-TOF MS 技术的猪呼吸道 RNA 病毒的多目标检测方法,用以检测 SIV、SIV-H1、SIV-H3、PRRSV、CSFV 及 FMDV 病毒,进一步完善了呼吸道症候群病原体检测体系,为疫病的快速诊断和相关病原体的中高通量检测提供了便利,适用于进出口动物检疫及相关疫病监测等情景。此外,本检测方法对猪流感病毒进行通用型和 H1、H3 型的分型检测,可进一步降低 SIV 的漏检率,在预防猪流感传播和大流行^[28]方面也具有一定的经济价值和公共卫生意义。

参考文献

- [1] 蒋大平. 猪呼吸道疾病原因与治疗方法[J]. 畜牧兽医学(电子版), 2020(6): 51-52.
JIANG DP. Causes and treatment of respiratory disease in pigs[J]. *Graziery Veterinary Sciences (Electronic Version)*, 2020(6): 51-52 (in Chinese).
- [2] VINCENT AL, PEREZ DR, RAJAO D, ANDERSON TK, ABENTE EJ, WALIA RR, LEWIS NS. Influenza A virus vaccines for swine[J]. *Veterinary Microbiology*, 2017, 206: 35-44.
- [3] 冯兆民, 朱闻斐, 舒跃龙. 欧亚类禽猪流感病毒病原学研究进展[J]. 病毒学报, 2022, 38(1): 205-211.
FENG ZM, ZHU WF, SHU YL. Research progress in the etiology of Eurasian avian-like swine influenza viruses[J]. *Chinese Journal of Virology*, 2022, 38(1): 205-211 (in Chinese).
- [4] GAO X, TAN BH, SUGRUE RJ, TANG K. MALDI mass spectrometry for nucleic acid analysis[J]. *Topics*

- in *Current Chemistry*, 2013, 331: 55-77.
- [5] 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.
- [6] 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).
- [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] SUN LY, ZHANG C, AN SH, CHEN XP, LI YM, XIU LS, XU BP, XIE ZD, PENG JP. Comprehensive description of pathogens and antibiotic treatment guidance in children with community-acquired pneumonia using combined mass spectrometry methods[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2021, 11: 695134.
- [9] 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, 12: 1858-1867.
- 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, 12: 1858-1867 (in Chinese).
- [10] SJÖHOLM MIL, DILLNER J, CARLSON J. Multiplex detection of human herpesviruses from archival specimens by using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2008, 46(2): 540-545.
- [11] PENG JP, YANG F, XIONG ZH, GUO JH, DU J, HU YF, JIN Q. Sensitive and rapid detection of viruses associated with hand foot and mouth disease using multiplexed MALDI-TOF analysis[J]. *Journal of Clinical Virology*, 2013, 56(2): 170-174.
- [12] XIU LS, ZHANG C, LI YM, WANG F, PENG JP. Simultaneous detection of eleven sexually transmitted agents using multiplexed PCR coupled with MALDI-TOF analysis[J]. *Infection and Drug Resistance*, 2019, 12: 2671-2682.
- [13] 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.
- [14] 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 MassARRAY for the determinations of 27 respiratory pathogens[J]. *Laboratory Medicine*, 2021, 36(9): 939-946 (in Chinese).
- [15] ZHANG C, XIAO Y, DU J, REN LL, WANG JW, PENG JP, JIN Q. Application of multiplex PCR coupled with matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight analysis for simultaneous detection of 21 common respiratory viruses[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2015, 53(8): 2549-2554.
- [16] PENG JP, GAO L, GUO JH, WANG T, WANG L, YAO Q, ZHU HJ, JIN Q. Type-specific detection of 30 oncogenic human papillomaviruses by genotyping both E6 and L1 genes[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2013, 51(2): 402-408.
- [17] 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.
- [18] 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 MALDI-TOF 核酸质谱的猪呼吸道病毒多目标鉴定方法的建立和应用[J/OL]. *微生物学报*, 2023, 63(7): 2713-2727.
- SONG SQ, QIU H, CHEN WJ, MO HF, JIN CC, ZENG RX, WANG W, GUO HM, SHUAI JB, WANG ZL, ZHANG XF. Establishment and application of a multi-target detection method for porcine respiratory viruses based on MALDI-TOF MS[J/OL]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2023, 63(7): 2713-2727 (in Chinese).
- [19] 石慧花. 国内部分地区样品猪流感 H1、H3 感染状况调查分析[D]. 上海: 上海交通大学硕士学位论文, 2015.
- SHI HH. Investigation and analysis on the infection of

- swine influenza H1 and H3 in some areas of China[D]. Shanghai: Master's Thesis of Shanghai Jiao Tong University, 2015 (in Chinese).
- [20] 国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 猪繁殖与呼吸综合征病毒荧光 RT-PCR 检测方法: GB/T 35912—2018[S]. 北京: 中国标准出版社, 2018.
General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, Standardization Administration of the People's Republic of China. Real-time RT-PCR method for detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: GB/T 35912—2018[S]. Beijing: Standards Press of China, 2018 (in Chinese).
- [21] 国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 猪瘟疫病毒实时荧光 RT-PCR 检测方法: GB/T 27540—2011[S]. 北京: 中国标准出版社, 2012.
General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, Standardization Administration of the People's Republic of China. Method of the real-time RT-PCR for the detection of classical swine fever virus: GB/T 27540—2011[S]. Beijing: Standards Press of China, 2012 (in Chinese).
- [22] 国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 口蹄疫病毒实时荧光 RT-PCR 检测方法: GB/T 27528—2011[S]. 北京: 中国标准出版社, 2012.
General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, Standardization Administration of the People's Republic of China. Real-time RT-PCR for detection of foot and mouth disease virus: GB/T 27528—2011[S]. Beijing: Standards Press of China, 2012 (in Chinese).
- [23] 张春明, 乔传玲, 陈艳, 杨焕良, 辛晓光, 陈化兰, 冉多良. 猪流感病毒 *M* 基因实时荧光定量 PCR 诊断方法的建立[J]. 中国预防兽医学报, 2008, 30(10): 805-810.
ZHANG CM, QIAO CL, CHEN Y, YANG HL, XIN XG, CHEN HL, RAN DL. Development of real-time fluorescent quantitative PCR for detection of *M* gene of swine influenza viruses[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2008, 30(10): 805-810 (in Chinese).
- [24] 王博, 王慧煜, 赵宝华, 罗静, 王承民, 何宏轩, 韩雪清. H1、H3 亚型猪流感病毒双重实时荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立及应用[J]. 中国畜牧兽医, 2017, 44(10): 3035-3041.
WANG B, WANG HY, ZHAO BH, LUO J, WANG CM, HE HX, HAN XQ. Development and application of duplex real-time RT-PCR assay for detection of H1 and H3 subtype swine influenza viruses[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2017, 44(10): 3035-3041 (in Chinese).
- [25] 毕保良, 李进涛. 猪流感诊断技术研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2009, 36(10): 179-183.
BI BL, LI JT. Research progress on diagnosis technology of swine influenza[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2009, 36(10): 179-183 (in Chinese).
- [26] 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).
- [27] 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.
- [28] 高灵茜, 崔梦一, 樊晓晖. 猪流感病毒基因池中的新成员: 新甲型 H1N1 流感病毒基因片段的存在及潜在威胁[J]. 中国人兽共患病学报, 2016, 32(9): 832-837.
GAO LX, CUI MY, FAN XH. The new member of the swine influenza virus gene pool: the existence of the 2009 pandemic H1N1 virus gene fragments and potential threats[J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2016, 32(9): 832-837 (in Chinese).