

20 豚の下痢症関連ウイルス 4 種を迅速かつ同時に検出可能なTaqManワンステップリアルタイムRT-PCR法の開発

倉吉家畜保健衛生所 ○増田恒幸 山里比呂志

1 はじめに

豚のウイルス性下痢症は、子豚の発育遅延や増体量の低下から養豚経営に損失を与える。下痢症の蔓延防止には正しい診断が必要であり、なおかつ迅速に診断を行うことは防疫対策を行う上で重要である。豚の下痢症を診断する上で臨床検査を行うが、豚流行性下痢 (PED) と伝染性胃腸炎 (TGE) はいずれも下痢と子豚の死亡といった同様な症状がみられ、臨床症状での識別は不能である。また典型的なPEDの症状を示さない、病勢の弱いPEDが存在することも報告されており、病勢の比較的穏やかなPRVAとの識別は難しい。さらに2010年に初めて香港で報告された豚デルタコロナウイルス (PDCoV) は、2014年2月に米国で下痢や嘔吐を呈した豚から検出され、その後、北米を中心に流行が確認されている (22)。わが国や韓国においても近年、PDCoVによる下痢症の報告が散発しており (12)、国内に定着したと考えられている。PDCoVは経口投与による感染実験において、PEDV、TGEVおよびPRVA同様に子豚の下痢に関連することが確認され、注意を要する疾病である (2、6)。

現在、豚のウイルス性下痢症の診断にはRT-PCR法が使われているが、近年報告されたPEDV (17) のように遺伝子に大きな欠損がある場合、そこを標的としたプライマーでは欠損株を検出できない可能性がある。また、牛のA群ロタウイルス (BRVA) は多様な遺伝子を保有しており、PRVAにおいても同様な多様性が確認されている (46)。このことから、遺伝子診断に用いるプライマーは流行している株に合ったものでなければならないと考えられる。

現在、牛の下痢症を迅速かつ省力的に検出する診断法として、BRVA、BRVB、BRVC、B CoVおよびBToVを検出するマルチプレックスRT-PCR法が現場で応用されている (3)。今回、豚の下痢症関連ウイルスの新たな診断法としてPEDV、TGEV、PDCoVおよびPRVAを特異的に、迅速かつ同時に検出可能なリアルタイムRT-PCR (qPCR) 法を開発し、さらに過去の野外病性鑑定材料を用いて、野外症例に応用可能かどうか確認を行ったので、その概要について報告する。

2 材料および方法

1) プライマーおよびプローブ

qPCR法の開発に当たり、PEDVおよびPDCoVに使用するプライマー・プローブセットは、PEDVについてはS遺伝子欠損株にも対応することを塩基配列のアライメントで確認した上で、既報のプライマー・プローブセット (8、13) を使用した。TGEVおよびPRVAについてはわが国での流行株に対応した新たなプライマー・プローブセットを、遺伝的に保存性が高いN遺伝子とVP6遺伝子 (10、18、21) を標的とし、GeneBankに登録されている国内株を含むTGEVとPRVA、それぞれ33株 (うち1株は未登録の国内株) と51株の塩基配列を

基に、PrimerQuest software (Integrated DNA Technologies, Inc, Iowa, USA) (ID T) を用いて設計した。設計したプライマー・プローブセットはNCBI BLASTを用いて特異性を確認した。本研究で使用するプライマー・プローブセットを表に示す。プローブは5'末端をリポーター蛍光のFAM (6-Carboxyfluorecein)、3'末端をクエンチャー蛍光のTAMRA (6-Carboxytetramethylrhodamine) でラベルした (表1)。

表1：プライマー・プローブ設計

ウイルス	プライマー/プローブ	標的遺伝子	Sequence(5'-3')	増幅産物サイズ (bp)	参考文献
PEDV	Forward	N	CGCAAAGACTGAACCCACTAATTT	198	8
	Reverse		TTGCCCTCTGTTGTTACTTGGAGAT		
	Probe*		TGTTGCCATTGCCACGACTOCTGC		
TGEV	Forward	N	AGCTATTGGACTTCAAAGGAAGATG	118	今回作成
	Reverse		CATAGGCATTAATCTGCTGAAGGAA		
	Probe		TCAOGTTTACACACAAAATACCACTTGCCA		
PDCoV	Forward	M	ATCGACCACATGGCTCCAA	72	13
	Reverse		CAGCTCTTGCCCATGTAGCTT		
	Probe		CACAACAGTCGTTAAGCATGGCAAGCT		
PRVA	Forward	VP6	GCAAGCGCCACCATTTATATTC	136	今回作成
	Reverse		TGCATACTCCTGAOCTACYGAT		
	Probe		TGTGAATCTGTGCTTGOGGAYGCTTC		

※プローブは5'末端をFAM、3'末端をTAMRAでラベルした

2) qPCR法の反応条件の検討

本試験ではコンタミネーションの防止および検査手技の簡便化を図るため、One-Step法を採用した。qPCR反応にはOne Step PrimeScript™ RT-PCR Kit (Perfect Real Time) (タカラバイオ(株)、滋賀)を用いた。10 μ lの2 \times One Step RT-PCR Buffer III、2.8 μ lのRNAase-free H₂O、0.4 μ lのTaKaRa Ex Taq HS (5 U/ μ l)、0.4 μ lのPrimeScript RT enzyme Mix II、プライマーとプローブの濃度を各4 μ Mに調整した混合液1 μ l とRNA 5 μ lを混和し全20 μ lとした。qPCRはABI7300 (Life Technologies Inc, Carlsbad, U.S.A)を使用し、全てのプライマー・プローブセットについて同じ条件で実施した。反応条件は42 $^{\circ}$ C 5分の逆転写反応の後、95 $^{\circ}$ C 10秒の酵素活性化後、熱変性95 $^{\circ}$ C 5秒、アニーリングと伸長反応を60 $^{\circ}$ C 34秒で40回繰り返した。蛍光シグナルはアニーリングと伸長反応のステップで検出した。ベースラインと閾値の設定はABI7300 Software v1.4 (Life Technologies Inc, Carlsbad, U.S.A)を用いてオート解析で実施した。

3) qPCR法の検出感度および解析性能についての評価

同じ反応条件における各反応の検出感度について、合成DNAを用いた検証を行った。合成DNAはqPCR法で標的とした塩基配列をもとに設計し、IDTから購入した。それぞれの標的ウイルスの合成DNAを 2.0×10^{-1} から 2.0×10^5 コピー/ μ lに10倍段階希釈しqPCR法を行った。1反応につき5 μ lの段階希釈液を使用したため1ウェルにつき 1×10^0 から 1×10^6 コ

ピーとなり、1検体につき2ウェルで2回反復して実施した。検出限界（LOD）は各反応において蛍光を検出することが出来た最低濃度とした。

4) qPCR法とRT-PCR法の感度比較

野外材料を用いて今回開発したqPCR法と既報のRT-PCR法との感度比較の検証試験を行った。PEDVとPRVAはVero細胞およびMA104細胞を用いて、鳥取県で哺乳豚から分離されたウイルスを試験に供した。TGEVとPDCoVについては、これらのウイルスを含む鳥取県および岩手県の豚の糞便材料を試験に供した。ウイルス感染細胞培養上清および糞便懸濁液から QIAamp viral RNA mini kit（キアゲン(株)、東京）を用いてRNAを抽出し、それらの10倍段階希釈液を作製した後、今回開発したqPCR法およびRT-PCR法を実施し、感度の比較を行った。PEDV、TGEVおよびPRVAについては既報のプライマーセット（5、9）を、PDCoVについてはpanncoronavirus検出用プライマーセット（15）を用いた。全てのRT-PCR法はQIAGEN OneStep RT-PCR法 Kit（キアゲン(株)、東京）を用いて実施した。

5) 野外病性鑑定材料

過去に病性鑑定を実施した豚の下痢症例のうち、PEDV、TGEV、PRVAに対するRT-PCR法（5、9、15）、PDCoVに対するqPCR法（13）、ウイルス免疫血清を用いた免疫組織化学的検索、常法によるサルモネラの検索およびRVA抗原検出イムノクロマト法（ディップスティック‘栄研’ロタ）により診断されている8症例23検体を使用した。各症例の内訳はPEDが4症例15検体（うち1症例1検体はPDCoVとの混合感染症）、TGEが1症例4検体、PDCoV感染症が1症例1検体、原因不明症例が1症例1検体（イムノクロマト法でRVAを検出）、サルモネラのサーベイランスに用いたものが2症例2検体（RT-PCR法でRVAを検出）であった。陰性対照として、過去に病性鑑定を実施した豚の下痢症のうち、PED、TGE、PDCoVおよびRVAが検出されなかった3症例22検体を使用した。各症例の内訳は豚B群ロタウイルス（PRVB）感染症1症例1検体、豚大腸菌症1症例4検体、原因不明症例1症例17検体であった。PRVBはRT-PCR法（11）により、病原性大腸菌については常法により診断した。発生状況および臨床症状、診断名等は表2に示す。

これらの糞便および小腸乳剤は、材料をEMEM（日水製薬（株）、東京）で10倍希釈後、3、000 rpmで10分間遠心分離した上清を0.45 μmシリンジフィルターで濾過後、-80℃で保存されていたものを使用した。

6) RNA抽出およびqPCR法の実施

-80℃で保存されていた糞便および小腸乳剤を融解後、QIAamp Viral RNA Mini Kit（キアゲン(株)）を用いてRNAを抽出した。抽出RNAを用いて開発したqPCR法を実施し、過去の病性鑑定の結果と比較した。

3 成績

1) qPCR法における各ウイルス遺伝子検出状況と反応時間

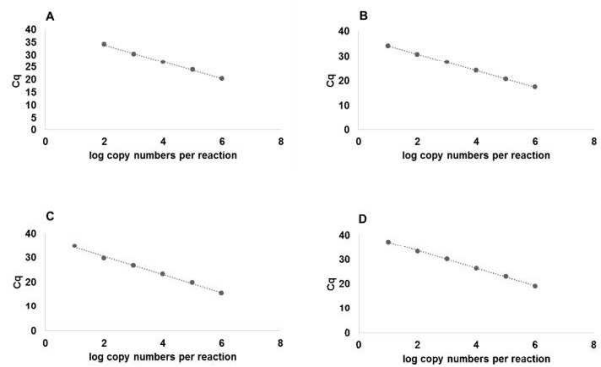
PEDV、TGEV、PDCoVおよびPRVAに対するプライマー・プローブセットにおいて各標的ウ

ウイルス遺伝子を同条件で増幅させることに成功した。また、これら4種の標的ウイルス遺伝子をRNA抽出後、約75分で検出することが可能であった。

2) LOD

合成DNAの段階希釈液を用いて実施した、PEDV、TGEV、PDCoVおよびPRVAに対する我々の開発したqPCR法の検出限界は、それぞれ、100、10、10および10 コピー/反応であった。各プライマー・プローブセットにおける検量線を図1に示す。

図1：各プライマー・プローブセットにおける検量線



A: PEDV, B: TGEV, C: PDCoV, D: PRVA

3) qPCR法とRT-PCR法の検出感度の比較

今回のqPCR法と既報のRT-PCR法の検出限界をRNAの希釈倍数で示すと、PEDVは 10^5 と 10^5 倍、TGEVは 10^4 と 10^2 倍、PDCoVは 10^4 と 10^1 倍、PRVAは 10^4 と 10^2 倍であった (図2)。

図2：qPCR法とRT-PCR法における各ウイルスに対する検出感度比較

RNA希釈列		10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	NC
PEDV	qPCR Cq	25.1	28.3	32.8	36.0	38.4	—	—
	RT-PCR							←651bp
TGEV	qPCR Cq	24.6	28.8	33.1	36.0	—	—	—
	RT-PCR							←859bp
PDCoV	qPCR Cq	26.1	29.2	34.0	36.0	—	—	—
	RT-PCR							←251bp
PRVA	qPCR Cq	24.3	28.0	33.1	36.0	—	—	—
	RT-PCR							←1062bp

※qPCRにおいて陽性の場合には定量サイクル値 (Cq) を示す

4) 野外病性鑑定材料への応用

表2に野外病性鑑定材料における開発したqPCR法の検出成績を示す。qPCR法では23検体中22検体で、標的ウイルスを検出することに成功した。しかし、検体No. 2でqPCR陰性となり、過去の病性鑑定成績と一致しなかった。検体No. 2はRT-PCR法において同じ症例の他の3検体と比較して陽性反応が弱い検体であった。検体No. 19はPEDVとTGEVの混合感染

症例であったが、qPCR法では両方のウイルスを問題なく検出できた。また全てのqPCR標的ウイルス遺伝子陽性検体において偽陽性と考えられる反応は認められず、従来の診断法で陰性であった検体は全てqPCR陰性であった。

表2：病性鑑定材料の詳細とqPCR法による標的ウイルス検出成績*

標的ウイルス	症例No.	従来法による診断名 または採材目的	検体No.	材料	発育 ステージ	臨床症状	PEDV	TGEV	PDCoV	PRVA
PEDV	1	PED	1	小腸乳剤	哺乳豚	下痢,脱水	+	-	-	-
		PED	2	小腸乳剤	哺乳豚	下痢,脱水	-	-	-	-
		PED	3	小腸乳剤	哺乳豚	下痢,脱水	+	-	-	-
		PED	4	小腸乳剤	哺乳豚	下痢,脱水	+	-	-	-
	2	PED	5	小腸乳剤	哺乳豚	下痢,嘔吐,脱水	+	-	-	-
		PED	6	小腸乳剤	哺乳豚	下痢,嘔吐,脱水	+	-	-	-
		PED	7	小腸乳剤	哺乳豚	下痢,嘔吐,脱水	+	-	-	-
		PED	8	小腸乳剤	哺乳豚	下痢,嘔吐,脱水	+	-	-	-
		PED	9	小腸乳剤	哺乳豚	下痢,嘔吐,脱水	+	-	-	-
		PED	10	小腸乳剤	哺乳豚	下痢,嘔吐,脱水	+	-	-	-
		PED	11	小腸乳剤	哺乳豚	下痢,嘔吐,脱水	+	-	-	-
		PED	12	小腸乳剤	哺乳豚	下痢,嘔吐,脱水	+	-	-	-
	3	PED	13	糞便乳剤	哺乳豚	下痢,脱水	+	-	-	-
		PED	14	糞便乳剤	哺乳豚	下痢,脱水	+	-	-	-
TGEV	4	TGE	15	小腸乳剤	哺乳豚	下痢,嘔吐,脱水	-	+	-	-
		TGE	16	小腸乳剤	哺乳豚	下痢,嘔吐,脱水	-	+	-	-
		TGE	17	小腸乳剤	哺乳豚	下痢,嘔吐,脱水	-	+	-	-
		TGE	18	小腸乳剤	哺乳豚	下痢,嘔吐,脱水	-	+	-	-
PDCoV	5	PEDVとPDCoVの混合感染症	19	糞便乳剤	哺乳豚	下痢,脱水	+	-	+	-
		PDCoV感染症	20	糞便乳剤	6ヶ月齢	下痢	-	-	+	-
PRVA	6	サルモネラサーベランス ^{a)}	21	糞便乳剤	4ヶ月齢	臨床症状なし	-	-	-	+
		原因不明 ^{b)}	22	糞便乳剤	不明	不明	-	-	-	+
陰性対照	7	サルモネラサーベランス ^{a)}	23	糞便乳剤	2ヶ月齢	臨床症状なし	-	-	-	+
			24	糞便乳剤	哺乳豚	下痢	-	-	-	-
			25	小腸乳剤	哺乳豚	下痢,脱水	-	-	-	-
			26	小腸乳剤	哺乳豚	下痢,脱水	-	-	-	-
	10	豚大腸菌症	27	小腸乳剤	哺乳豚	下痢,脱水	-	-	-	-
			28	小腸乳剤	哺乳豚	下痢,脱水	-	-	-	-
			29	糞便乳剤	哺乳豚	下痢	-	-	-	-
			30	糞便乳剤	哺乳豚	下痢	-	-	-	-
	原因不明	原因不明	31	糞便乳剤	哺乳豚	下痢	-	-	-	-
			32	糞便乳剤	哺乳豚	下痢	-	-	-	-
			33	糞便乳剤	哺乳豚	下痢	-	-	-	-
			34	糞便乳剤	哺乳豚	下痢	-	-	-	-
			35	糞便乳剤	哺乳豚	下痢	-	-	-	-
			36	糞便乳剤	哺乳豚	下痢	-	-	-	-
			37	糞便乳剤	哺乳豚	下痢	-	-	-	-
			38	糞便乳剤	哺乳豚	下痢	-	-	-	-
			39	糞便乳剤	哺乳豚	下痢	-	-	-	-
40			糞便乳剤	哺乳豚	下痢	-	-	-	-	
41			糞便乳剤	哺乳豚	下痢	-	-	-	-	
42			糞便乳剤	哺乳豚	下痢	-	-	-	-	
43			糞便乳剤	哺乳豚	下痢	-	-	-	-	
44	糞便乳剤	哺乳豚	下痢	-	-	-	-			
45	糞便乳剤	哺乳豚	下痢	-	-	-	-			

*：qPCR法陽性を+、陰性を-で示す

a) 下痢などの臨床症状を呈さないがPRVA遺伝子が検出された検体

b) 臨床症状は不明だがイムノクロマト法による検査でPRVAが検出された検体

4 考察

代表的な豚の下痢症の原因ウイルスであるPEDVおよびTGEVを同時に検出可能なマルチプレックスRT-PCR法やqPCR法が報告されており、迅速診断法として広く用いられている（1、8、9、24）。しかし、PEDV、TGEV、PDCoVおよびPRVAの4種の異なるウイルスを同時に検出可能なqPCR法での検出系は現在報告されていないと思われる。また、qPCR法はRT-PCR法と比較し、高感度で多量高速検体処理が可能といわれている（4、7）。このため、本試験ではこれら4種のウイルスを同時に検出可能なqPCR法の反応系を新たに開発した。

本試験ではコンタミネーションのリスクを最小限に、反応時間を短縮するためにワンステップ法を採用した。PEDVとPDCoVについては既報のプライマー・プローブセット（8、13）を用いたが、TGEVとPRVAについては保存性の高い領域、すなわちN遺伝子およびVP6遺伝子を標的にし、新たにプライマー・プローブセットを設計した。全てのプライマー・プローブセットにおいて特異的に標的ウイルスの遺伝子を検出することに成功し、偽陽性反応も認められなかった。さらに全ての標的遺伝子を同条件で増幅させることが可能であるため、迅速診断にとって理想的な反応条件を確立することに成功した。今回のqPCR法の検出限界はPEDV、TGEV、PDCoVおよびPRVAにおいて、それぞれ100、10、10および10コピー/反応であった。この結果は既報のqPCR法と同様、あるいはそれ以上の値であった（7、8、23）。また、qPCR法はRT-PCR法と比較して検出感度が高いという報告が多数なされている（7、16、19、20）。本試験では、臨床検体由来の各ウイルスRNAの10倍段階希釈液を用いて、qPCR法と既報のRT-PCR法の感度について比較を実施した。その結果、今回のqPCR法の検出感度はPEDVでは同程度であったものの、TGEV、PDCoVおよびPRVAでは100倍から1000倍高感度であった。

今回開発したqPCR法の実際の臨床現場への応用を検討するため、過去に病性鑑定を実施した野外材料を用いて実施した。従来の診断法で陽性と診断された検体を用いた試験では、ほぼ全ての検体から標的ウイルスを特異的に検出することに成功した。しかし、PEDVのRT-PCR法において弱陽性反応が確認されていた検体No. 2においてのみqPCR法で陰性となった。PEDVにおけるRT-PCR法とqPCR法の検出感度は同等であったことから、検体No. 2におけるPEDVの遺伝子量が少なかったためにqPCR法で検出できなかったと考えられた。検体No. 1～4は全て同じ症例の同腹哺乳豚であり、PEDVによる激しい水様下痢とそれに伴う脱水が顕著であった。剖検所見において、小腸は顕著にひ薄化し、小腸内容が非常に常に少なかったために、全ての検体から等量の材料を採取できず、No. 2の遺伝子量が少なくなってしまうと考えられた。症例No. 2の検体No. 5～12はS遺伝子に大きな欠損が認められたPEDVによる症例である。S遺伝子に欠損が認められたもののqPCR法における標的遺伝子はN遺伝子であるため、7検体全てqPCR法で検出可能であった。また症例1とほぼ同じ日齢による哺乳豚の下痢症であったが、臨床症状は軽度であり、小腸のひ薄化の程度も軽度であったため、材料の採材用意で十分な検体を得ることが出来たため、7検体全てでqPCR陽性となったと考えられた。

検体No. 19はPEDVとPDCoVとの混合感染症例である。qPCR法では検体No. 19よりPEDVおよびPDCoVの両方を検出することが可能であり、複数のウイルスによる混合感染症例の診断にも本法は有効であることが示唆された。

本試験では、豚の下痢症関連ウイルス4種の遺伝子を迅速かつ特異的に検出することが可能なqPCR法を開発した。本法はワンステップ法を採用しているため、手技が簡易でコンタミネーションの危険性も少ない。検出感度も既報のRT-PCR法と比較して同等またはそれ以上であり、各標的ウイルス遺伝子の検出時間も大幅に短縮された。このため豚の下痢症の迅速診断法として非常に有用であると考えられる。過去の病性鑑定材料を用いてqPCR法を実施した結果、豚の下痢症の原因ウイルスを概ね検出することが可能で、偽陽性反応も認められなかった。以上の成績から、今回開発したqPCR法は迅速かつ特異性

の高い診断法として、豚の下痢症の病性鑑定に非常に有用な手法であると考えられた。

5 謝辞

本稿を終えるにあたり多くのご助言を頂きました東京農工大学農学部国際家畜感染症防疫研究教育センターの土赤忍氏、PDCoVのRNAを分与して頂いた岩手県農林水産部畜産課の福成和博氏に深謝いたします。

6 参考文献

1. Ben Salem, A. N., Chupin Sergei, A., Bjadovskaya Olga, P., Andreeva Olga, G., Mahjoub, A. and Prokhvatilova Larissa, B. (2010). Multiplex nested RT-PCR for the detection of porcine enteric viruses. *J. Virol. Methods.* 165, 283-293.
2. Chen, Q., Gauger, P., Stafne, M., Thomas, J., Arruda, P., Burrough, E., Madison, D., Brodie, J., Magstadt, D., Derscheid, R., Welch, M. and Zhang, J. (2015). Pathogenicity and pathogenesis of a United States porcine deltacoronavirus cell culture isolate in 5-day-old neonatal piglets. *Virology.* 482, 51-59.
3. Fukuda, M., Kuga, K., Miyazaki, A., Suzuki, T., Tasei, K., Aita, T. and Masae, M. (2012). Development and application of one-step multiplex reverse transcription PCR for simultaneous detection of five diarrheal viruses in adult cattle. *Arch. Virol.* 157, 1063-1069.
4. Giulietti, A., Overbergh, L., Valckx, D., Decallonne, B., Bouillon, R. and Mathieu, C. (2001). An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods.* 25, 386-401.
5. Gouvea, Y., Glass, R. I., Woods, P., Taniguchi, K., Clark, H. F., Forrester, B. and Fang, Z. (1990). Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J. Clin. Microbiol.* 28, 276-282.
6. Jung, K., Hu, H., Eyerly, B., Lu, Z., Chepngeno, J. and Saif, L. J. (2015). Pathogenicity of 2 porcine deltacoronavirus strains in gnotobiotic pigs. *Emerg. Infect. Dis.* 21, 650-654.
7. Keyaerts, E., Vijgen, L., Maes, P., Duson, G., Neyts, J. and Van Ranst, M. (2006). Viral load quantitation of SARS-coronavirus RNA using a one-step real-time RT-PCR. *Int. J. Infect. Dis.* 10, 32-37.
8. Kim, S. H., Kim, I. J., Pyo, H. M., Tark, D. S., Song, J. Y. and Hyun, B. H. (2007). Multiplex real-time RT-PCR for the simultaneous detection and quantification of transmissible gastroenteritis virus and porcine epidemic diarrhoea virus. *J. Virol. Methods.* 146, 172-177.
9. Kim, S. Y., Song, D. S. and Park, B. K. (2001). Differential detection of tran

- missible gastroenteritis virus and porcine epidemic diarrhea virus by duplex RT-PCR. *J. Vet. Diagn. Invest.* 13, 516-520.
10. Kocherhans, R., Bridgen, A., Ackermann, M. and Tobler, K. (2001). Completion of the porcine epidemic diarrhoea coronavirus (PEDV) genome sequence. *Virus Genes.* 23, 137-144.
 11. Kuga, K., Miyazaki, A., Suzuki, T., Takagi, M., Hattori, N., Katsuda, K., Mase, M., Sugiyama, M. and Tsunemitsu, H. (2009). Genetic diversity and classification of the outer capsid glycoprotein VP7 of porcine group B rotaviruses. *Arch. Virol.* 154, 1785-1795.
 12. Lee, S. and Lee, C. (2014). Complete genome characterization of Korean porcine deltacoronavirus Strain KOR/KNU14-04/2014. *Genome Announc.* 2, 6.
 13. Marthaler, D., Raymond, L., Jiang, Y., Collins, J., Rossow, K. and Rovira, A. (2014). Rapid detection, complete genome sequencing, and phylogenetic analysis of porcine deltacoronavirus. *Emerg. Infect. Dis.* 20, 1347-1350.
 14. Matthijnsens, J., Ciarlet, M., McDonald, S. M., Attoui, H., Banyai, K., Brister, J. R., Buesa, J., Esona, M. D., Estes, M. K., Gentsch, J. R., Iturza-Gomara, M., Johne, R., Rahman, M., Ruggeri, F. M., Saif, L. J., Santos, N., Steyer, A., Taniguchi, K., Patton, J. T., Desselberger, U. and Van Ranst, M. (2011). Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Arch. Virol.* 156, 1397-1413.
 15. Moës, E., Vijgen, L., Keyaerts, E., Zlateva, K., Li, S., Maes, P., Pyrc, K., Berkhout, B., van der Hoek, L. and Van Ranst, M. (2005). A novel pancoronavirus RT-PCR assay: frequent detection of human coronavirus NL63 in children hospitalized with respiratory tract infections in Belgium. *BMC. Infect. Dis.* 5, 6
 16. Subhadra. S., Kumar, S., Suryanarayana, V. V. and Sreenivasulu. D. (2014). Comparison of bluetongue virus detection and quantitation methods in south India. *J. Infect. Dev. Ctries.* 8, 1307-1312.
 17. Suzuki, T., Murakami, S., Takahashi, O., Kodera, A., Masuda, T., Itoh, S., Miyazaki, A., Ohashi, S. and Tsutsui, T. (2015). Molecular characterization of pig epidemic diarrhoea viruses isolated in Japan from 2013 to 2014. *Infect. Genet. Evol.* 36, 363-368.
 18. Sánchez, C. M., Jiménez, G., Laviada, M. D., Correa, I., Suné, C., Bullido, M., Gebauer, F., Smerdou, C., Callebaut, P., Escribano, J. and Enjuanes, L. (1990). Antigenic homology among coronaviruses related to transmissible gastroenteritis virus. *Virology.* 174, 410-417.
 19. Tang, J., Khan, S., Delmiglio, C. and Ward, L. I. (2014). Sensitive detection of Tomato ringspot virus by real-time TaqMan RT-PCR targeting the highly conserved 3'-UTR region. *J. Virol. Methods.* 201, 38-43.

20. Timsit, E., Maingourd, C., Le Dréan, E., Belloc, C., Seegers, H., Douart, A. and Assié, S. (2010). Evaluation of a commercial real-time reverse transcription polymerase chain reaction kit for the diagnosis of Bovine respiratory syncytial virus infection. *J. Vet. Diagn. Invest.* 22, 238-241.
21. Varghese, V., Das, S., Singh, Ng. B., Kojima, K., Bhattacharya, S. K., Krishnan, T., Kobayashi, N. and Naik, T. N. (2004). Molecular characterization of a human rotavirus reveals porcine characteristics in most of the genes including VP6 and NSP4. *Arch. Virol.* 149, 155-172.
22. Wang, L., Byrum, B. and Zhang, Y. (2014). Detection and genetic characterization of deltacoronavirus in pigs, Ohio, USA, 2014. *Emerg. Infect. Dis.* 20, 1227-1230.
23. Yu, H. Q., Cai, X. Q., Lin, Z. X., Li, X. L., Yue, Q. Y., Li, R. and Zhu, X. Q. (2015). Rapid and specific detection of porcine parvovirus using real-time PCR and High Resolution Melting (HRM) analysis. *BMC. Vet. Res.* 11, 46.
24. Zhao, J., Shi, B. J., Huang, X. G., Peng, M. Y., Zhang, X. M., He, D. N., Pang, R., Zhou, B. and Chen, P. Y. (2013). A multiplex RT-PCR assay for rapid and differential diagnosis of four porcine diarrhea associated viruses in field samples from pig farms in East China from 2010 to 2012. *J. Virol. Methods.* 194, 107-112