

沈丽雅, 潘群兴, 卢凤英, 等. 基于 P18 蛋白基因的新型鸭呼肠孤病毒荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立[J]. 江苏农业学报, 2021, 37(6): 1481-1487.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2021.06.016

基于 P18 蛋白基因的新型鸭呼肠孤病毒荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立

沈丽雅^{1,2}, 潘群兴¹, 卢凤英¹, 董永毅³, 张敬峰¹, 吴 坤³, 刘青涛¹, 姜 平², 张小飞¹

(1.江苏省农业科学院兽医研究所, 江苏 南京 210014; 2.南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095; 3.江苏省动物疫病预防控制中心, 江苏 南京 210009)

摘要: 根据新型鸭呼肠孤病毒(Novel duck reovirus, NDRV)特有的非结构蛋白 P18 基因保守序列设计 1 对特异性引物,建立了 NDRV 荧光定量 RT-PCR 检测方法。用该方法和普通 RT-PCR 方法对 239 份临床样品进行检测, NDRV 阳性检出率分别为 23.85%(57/239)和 17.57%(42/239), 荧光定量 RT-PCR 检测方法的检出率明显高于普通 RT-PCR 检测方法。随机取 5 份荧光定量 RT-PCR 检测方法检测的阳性的样品用鸭胚进行病毒分离培养,经普通 RT-PCR 扩增和基因测序证明均为 NDRV。用 $10^{3.0}$ ELD₅₀ 剂量的 NDRV-SY 株人工感染 14 日龄雏鸭,不同时间采集泄殖腔拭子样品,通过荧光定量 RT-PCR 检测方法进行排毒情况监测,结果显示,雏鸭人工感染 NDRV 48 h 时可以从泄殖腔检测到病毒排出,持续时间可达 20 d,并发现在病毒感染后的第 5 d 和第 10 d 出现 2 次排毒高峰。试验结果表明,建立的 NDRV 荧光定量 RT-PCR 检测方法具有良好的特异性和较高的敏感性,可用于 NDRV 感染的排毒监测以及临床感染的早期诊断和流行病学调查。

关键词: 新型鸭呼肠孤病毒; P18 蛋白基因; 荧光定量 RT-PCR

中图分类号: S858.325.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2021)06-1481-07

Establishment of SYBR Green I fluorescence quantitative RT-PCR assay for detection of novel duck reovirus based on the gene encoding P18 protein

SHEN Li-ya^{1,2}, PAN Qun-xing¹, LU Feng-ying¹, DONG Yong-yi³, ZHANG Jing-feng¹, WU Kun³, LIU Qing-tao¹, JIANG Ping², ZHANG Xiao-fei¹

(1. Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 2. College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 3. Jiangsu Provincial Center for Animal Disease Control and Prevention, Nanjing 210009, China)

收稿日期: 2021-03-19

基金项目: 国家重点研发计划项目(2017YFD0500804); 江苏现代农业(水禽)产业技术体系疾病防控创新团队项目[JATS (2020)321]

作者简介: 沈丽雅(1996-), 女, 浙江湖州人, 硕士研究生, 主要从事动物传染病防治研究。(Tel) 15205172927; (E-mail) 823320658@qq.com

通讯作者: 张小飞, (E-mail) xiaofei0804@sina.com; 姜 平, (E-mail) jiangp@njau.edu.cn

Abstract: In order to rapidly detect the novel duck reovirus (NDRV), the SYBR Green I fluorescence quantitative RT-PCR method was established with a pair of specific primers designed according to the conservative gene sequence of the unique non-structural protein P18 of NDRV. 239 clinical samples were detected by the fluorescence quantitative RT-PCR method and ordinary RT-PCR methods, and the positive detection rates of the samples were 23.85% (57/239) and 17.57% (42/239), respec-

tively. The detection rate of fluorescence quantitative RT-PCR method was significantly higher than that of ordinary RT-PCR method. Five samples were randomly selected for virus culture with duck embryo from the NDRV positive samples by the fluorescence quantitative RT-PCR method. It was proved that the five isolated viruses were NDRV by ordinary RT-PCR amplification and DNA sequencing technique. The 14-day-old ducklings were artificially infected with NDRV-SY strain at a dose of $10^{3.0} ELD_{50}$, and the cloaca swabs of these ducklings were collected for NDRV detection by this fluorescence quantitative RT-PCR at different time points. The results showed that the inoculated ducklings shed virus as early as 48 hours post inoculation, and could continue until 20 days post inoculation. In addition, two peaks of viral titers were observed at five and ten days post inoculation. Therefore, the established fluorescence quantitative RT-PCR is specific and sensitive, and can be used for the detection of NDRV, early diagnosis of clinical infection and epidemiological investigation.

Key words: novel duck reovirus; gene encoding P18 protein; fluorescence quantitative RT-PCR

鸭呼肠孤病毒病已成为危害中国水禽养殖业的重要疫病,番鸭、麻鸭、半番鸭和北京鸭均可感染呼肠孤病毒(Reovirus, RV)并发病。根据宿主和病变的差异,鸭呼肠孤病毒病分为 3 种主要类型,即番鸭“白点病”、番鸭“新肝病”和北京鸭“脾坏死病”,其病原分别为 MDRV^[1-2]、新致病型番鸭呼肠孤病毒(New pathotype of Muscovy duck reovirus, N-MDRV)^[3-4]和新型鸭呼肠孤病毒(Novel duck reovirus, NDRV)^[5-6]。2017 年以来该病的发生率迅速上升,主要感染 1 月龄以内的雏鸭,且发病率和死亡率随着日龄的减少而升高。感染 NDRV 使得雏鸭出现免疫抑制,往往继发一些细菌性疾病,临床上报道过大肠杆菌和鸭疫里默氏杆菌与 NDRV 混合感染的病例^[7-8]。

NDRV 的基因节段可分为 3 组,即 L(大)、M(中)和 S(小)共 10 个 RNA 片段,其中 S 组有 S1、S2、S3、S4 4 个基因片段^[9-10]。NDRV 的 S1 基因片段编码非结构蛋白 P10、P18 和 σ C;而 MDRV 的 P10 和 σ C 蛋白则是由 S4 基因片段编码,缺少编码 P18 蛋白对应的基因^[11-13],因此,非结构蛋白 P18 基因为 NDRV 特有基因。研究结果显示,在感染细胞后第 6 h P18 即可被检测到,表明该蛋白质为病毒感染早期表达的非结构蛋白,参与病毒的复制^[14-15]。因此本研究选择 NDRV P18 蛋白基因为检测靶标,建立 NDRV 荧光定量 RT-PCR 的检测方法,并应用该方法检测临床送检样品和 NDRV 强毒株(SY 株)人工感染雏鸭不同时间的排毒情况。

1 材料与方法

1.1 毒株、SPF 鸡胚、雏鸭

新型鸭呼肠孤病毒(NDRV SY 株)、鸭源禽腺病毒 4 型(FAdV-4, SD2016-1 株)、番鸭呼肠孤病毒

(MDRV, CA 株)、鸭甲型肝炎病毒 1 型(DHAV-1, W 株)、鸭甲型肝炎病毒 3 型(DHAV-3, SD 株)、鸭坦布苏病毒(DTMUV, JS2010 株)、鸭瘟病毒(DEV, AV1221 株)、鸭圆环病毒(DuCV, AQ0901 株)、鸭源 H9 亚型禽流感病毒(AIV-H9, NJ01 株)由江苏省农业科学院兽医研究所保存。SPF 鸭胚购自中国农业科学院哈尔滨兽医研究所的 SPF 鸭种蛋,本实验室孵化至 11 日龄;雏鸭由江苏省农业科学院黄梅实验动物基地 NDRV 抗体阴性麻鸭所产种蛋孵化。

1.2 主要试剂

Hifair[®] III 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix for qRT-PCR (gDNA digester plus) 反转录试剂盒、Hieff[®] qPCR SYBR Green Master Mix (High Rox Plus) 荧光定量试剂盒购自上海翊圣生物科技有限公司,核酸提取试剂盒、质粒提取试剂盒、DNA 凝胶回收盒购自 Axygen 公司。

1.3 荧光定量 RT-PCR 方法的建立

1.3.1 引物的设计与合成 根据已发表的 NDRV P18 蛋白基因的高度保守区序列,利用 Primer Premier 5.0 引物设计软件设计一对特异性引物,上游引物(Primer-F)为 5'-CTTCGTGATGTCCTCCCGC-3',下游引物(Primer-R)为 5'-CGTCGCTTGACTGGTAGGGG-3',预期目的片段大小为 366 bp。引物由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。

1.3.2 标准质粒的构建 以 NDRV SY 株核酸为模板和 NDRV P18 蛋白基因特异性引物进行常规 RT-PCR 扩增,获得 NDRV P18 蛋白基因片段,将其克隆到 pMD18-T 载体,获得克隆质粒 pMD18-P18。挑取重组菌并提取质粒进行 PCR 鉴定,鉴定为阳性的菌送南京擎科生物技术有限公司测序,并与 GenBank 中的已公布的 NDRV 分离株序列进行同源性比较。

1.3.3 荧光定量 RT-PCR 方法反应条件的优化 以

构建的重组 pMD18-*P18* 标准质粒为模板,采用 Hieff® qPCR SYBR Green Master Mix (High Rox) 试剂盒推荐的 20 μ l 反应体系,对退火温度(55~65 $^{\circ}$ C)和引物量(0.1 μ l、0.2 μ l、0.4 μ l、0.6 μ l)进行优化。

1.3.4 荧光定量 RT-PCR 方法标准曲线的建立 将构建的重组 pMD18-*P18* 标准质粒按 10 倍梯度稀释,取 1 μ l $1.42 \times 10^3 \sim 1.42 \times 10^8$ 拷贝的标准质粒为模板,用优化后的反应体系和反应条件进行检测,以 *Ct* 值为纵坐标,以稀释的阳性标准品拷贝数常用对数为横坐标,绘制标准曲线。

1.3.5 特异性试验 以 NDRV、FAdV-4、MDRV、DHAV-3、DHAV-1、DTMUV、DEV、DuCV、AIV-H9 病毒的 cDNA 为模板,用优化后的反应条件进行荧光定量 RT-PCR 检测,检验该方法的特异性。

1.3.6 敏感性试验 以 10 倍倍比稀释(1 μ l $1.42 \times 10^1 \sim 1.42 \times 10^7$ 拷贝)的标准质粒为模板,用优化后的反应条件进行荧光定量 RT-PCR 反应,检验该方法的敏感性。

1.3.7 重复性试验 以同一批次提取的 pMD18-*P18* 阳性标准质粒的 3 个不同含量(1 μ l $1.42 \times 10^3 \sim 1.42 \times 10^5$ 拷贝)和不同批次提取的阳性标准质粒的 3 个不同含量(1 μ l $1.42 \times 10^3 \sim 1.42 \times 10^5$ 拷贝)为模板进行检测,计算其组内变异系数和组间变异系数。

1.3.8 临床样品检测 将 2020 年江苏省、山东省等地区鸭场送检的 239 份临床样品,提取核酸并反转录后,利用建立的 NDRV 荧光定量 RT-PCR 方法进行检测,同时进行常规 RT-PCR 方法检测^[16],比较检测结果。

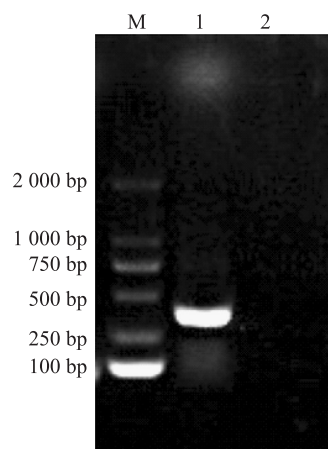
1.3.9 病毒分离与鉴定 随机取 5 份荧光定量 RT-PCR 检测 NDRV 阳性的样品(脾脏或肝脏),分别用含双抗各 1 000 IU 的生理盐水制成 1:5 匀浆,37 $^{\circ}$ C 作用 1 h,冻融 3 次,6 000 *g* 离心 10 min,上清液用 0.22 μ m 滤器过滤除菌,经尿囊腔途径接种 11 日龄 SPF 鸭胚 5 枚,每 1 枚 0.2 ml,37 $^{\circ}$ C 孵化,24 h 内的死胚弃去,每日照胚 2 次,取出死胚置 2~8 $^{\circ}$ C 暂存,至 120 h 时取出剩余胚置 2~8 $^{\circ}$ C 过夜。无菌收获尿囊液,按样品将收获的尿囊液混合,分别对 5 份鸭胚尿囊液混合样进行 RT-PCR 扩增和测序分析,针对 NDRV 特有的 P18 蛋白基因设计的上游引物(*P18*-F)为 5'-ATGTCACCTCCCGCCAACC-3',下游引物(*P18*-R)为 5'-CAGTTGTTGATTGTAGA T-3',预期目的片段大小为 488 bp。

1.3.10 人工感染雏鸭试验 设置 15 只 14 日龄的健康雏鸭作为试验组,每只腿部皮下注射 1.0 ml NDRV-SY 株(病毒滴毒为 1 ml 1×10^3 ELD₅₀),另设置 15 只 14 日龄健康雏鸭作为对照组,每只腿部皮下注射 1.0 ml 生理盐水。在攻毒后 7 d,从试验组和对照组随机选择 9 只雏鸭进行剖检,观察病理变化。攻毒后 6 h 开始用无菌棉签采集雏鸭泄殖腔肛拭子样品置于生理盐水中,第 1 d 每隔 6 h 采集一次,2~3 d 每隔 12 h 采集一次,4~30 d 每天采集一次,-80 $^{\circ}$ C 保存。将采集的肛拭子样品冻融 3 次后经漩涡振荡,8 000 r/min 离心 4 min,取 200 μ l 上清液,用试剂盒提取 RNA,并反转录为 cDNA,共收集到 624 份鸭肛拭子 cDNA 样品(312 份为 NDRV 人工感染麻鸭试验组肛拭子 cDNA,312 份为健康雏鸭肛拭子 cDNA)。用建立的荧光定量 RT-PCR 方法对样品 cDNA 进行检测,每个样品重复 3 次,根据 *Ct* 值和溶解曲线分析 NDRV 感染鸭的排毒情况。

2 结果

2.1 重组 pMD18-*P18* 标准质粒的构建

重组 pMD18-*P18* 标准质粒经 PCR 鉴定,得到 1 条 366 bp 的特异性片段,与预期目的片段大小相符(图 1)。测序结果进行 Blast 比对,结果显示,扩增的 P18 蛋白基因片段与 GenBank 上公布的 NDRV 不同分离株的 *S1* 基因片段的 P18 蛋白基因序列同源性高达 99.7% 以上,表明 PCR 扩增的目的基因是 NDRV 病毒基因组中高度保守区序列, pMD18-*P18* 质粒构建成功。



M: DNA marker 2 000; 1: pMD18-*P18* 标准质粒; 2: 阴性对照。

图 1 标准质粒的 PCR 扩增

Fig.1 PCR amplification results of standard plasmids

2.2 荧光定量 RT-PCR 反应体系及条件优化

对引物量、退火温度进行优化,最终确定 NDRV 实时荧光定量 RT-PCR 最优反应体系 (20.0 μl): Hieff[®] qRT-PCR SYBR Green Master Mix (High Rox) 10.0 μl , 引物 F/R (10 $\mu\text{mol/L}$) 各 0.1 μl , 模板 2.0 μl , DEPC 水 7.8 μl 。最优反应条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 62 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 40 个循环。

2.3 NDRV 荧光定量 RT-PCR 标准曲线

将标准质粒 10 倍梯度稀释为模板进行荧光定量 RT-PCR 反应,并绘制 NDRV 的标准曲线(图 2)。结果显示,标准曲线在 1 μl $1.42 \times 10^3 \sim 1.42 \times 10^8$ 拷贝具有良好的线性关系,标准曲线的相关系数为 0.998,扩增效率为 90.105%。NDRV 的拷贝数与 C_t 值之间的线性关系表达式为: $Y = -3.582x + 36.430$, 其斜率为 -3.582,截距为 36.43。依据此表达式,已知检测样品的 C_t 值,便可进行准确定量。NDRV 标准质粒溶解曲线峰值单一(图 3),溶解温度在 84.94 $^{\circ}\text{C}$ 左右。

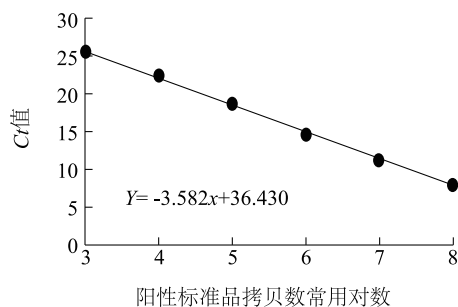


图 2 实时荧光定量 RT-PCR 标准曲线

Fig.2 Standard curve of real-time fluorescence quantitative RT-PCR

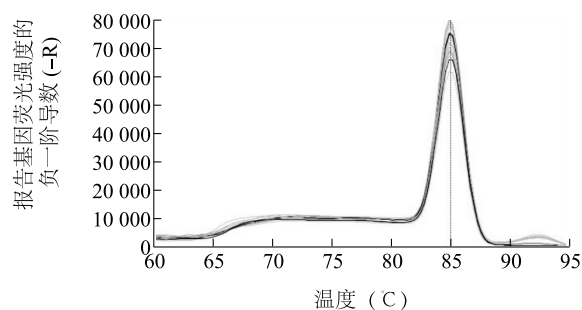


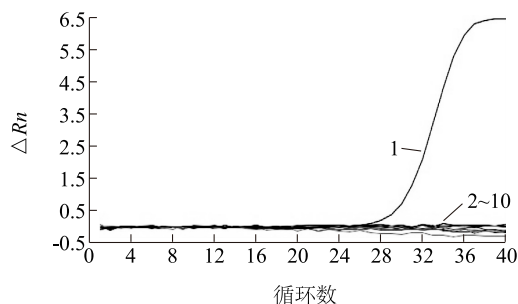
图 3 实时荧光定量 RT-PCR 溶解曲线

Fig.3 Melting curve of real-time fluorescence quantitative RT-PCR

2.4 NDRV 荧光定量 RT-PCR 检测方法的特异性

用建立的荧光定量 RT-PCR 检测方法对不同病

毒的核酸进行检测,结果显示,只有 NDRV 病毒核酸有扩增曲线,判定为阳性,而 FAdV-4、MDRV、DHAV-3、DHAV-1、DTMUV、DEV、DuCV、AIV-H9 病毒和阴性对照均未出现特异性扩增曲线(图 4)。



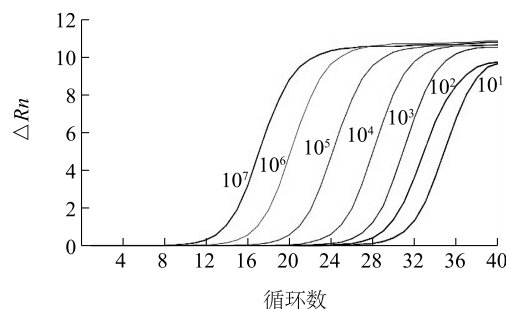
ΔRn = 每点测量的荧光强度 - 荧光基线强度。1: NDRV; 2~9: FAdV-4、MDRV、DHAV-3、DHAV-1、DTMUV、DEV、DuCV、AIV-H9; 10: 阴性对照。

图 4 实时荧光定量 RT-PCR 检测方法的特异性

Fig.4 Specificity of real-time fluorescence quantitative RT-PCR detection method

2.5 NDRV 荧光定量 RT-PCR 检测方法的敏感性

用建立的实时荧光定量 PCR 检测 10 倍梯度稀释 (1 μl $1.42 \times 10^1 \sim 1.42 \times 10^7$ 拷贝) 的阳性标准质粒。结果显示,标准质粒均出现特异性扩增,该方法最低可以检出 1 μl 1.42×10^1 拷贝的模板(图 5)。



ΔRn = 每点测量的荧光强度 - 荧光基线强度。

图 5 实时荧光定量 RT-PCR 检测方法的敏感性

Fig.5 Sensitivity of real-time fluorescence quantitative RT-PCR detection method

2.6 NDRV 荧光定量 RT-PCR 检测方法的重复性

对同一批次的标准质粒 3 个不同含量 (1 μl $1.42 \times 10^3 \sim 1.42 \times 10^5$ 拷贝) 和不同批次的标准质粒 3 个不同含量 (1 μl $1.42 \times 10^3 \sim 1.42 \times 10^5$ 拷贝) 模板进行检测。结果显示,组内和组间 C_t 值变异系数均小于 0.5% (表 1)。

2.7 临床样品检测结果

用建立的荧光定量 RT-PCR 检测方法对 239 份临床样品进行检测,检出阳性样品 57 份,检出率为 23.85%;普通 RT-PCR 检测方法检出阳性样品 42 份,检出率为 17.57%。临床样品检出阳性率高于普通 RT-PCR 检测方法,且二者的检测符合率为 93.7%。说明建立的荧光定量 RT-PCR 检测方法比普通 RT-PCR 检测方法更适合 NDRV 临床的准确检测(表 2)。

表 2 实时荧光定量 RT-PCR 检测方法的临床检测结果

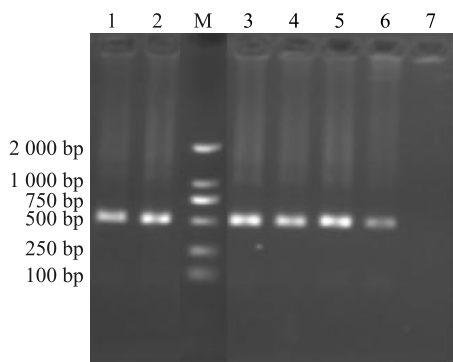
Table 2 Clinical results of real-time fluorescence quantitative RT-PCR detectin method

方法	样品数	阳性检出数	阳性检出率(%)	共同阳性数	共同阴性数	检测符合率(%)
荧光定量 RT-PCR 检测方法	239	57	23.85	42	182	93.7
普通 RT-PCR 检测方法	239	42	17.57			

检测符合率=(共同阳性数+共同阴性数)/总样品数×100%。

2.8 NDRV 病毒分离与鉴定

5 份荧光定量 RT-PCR 检测 NDRV 阳性的组织样品经处理后,分别接种 11 日龄 SPF 鸭胚各 5 枚,5 个样品接种的鸭胚于接种后 96~120 h 均有 1~2 枚胚死亡。对每个接种样品的死亡胚和 120 h 存活胚尿囊液收获后混合,进行 P18 蛋白基因 RT-PCR 扩增,5 份样品的鸭胚尿囊液均扩增出 488 bp 目的基因片段,大小与预期结果相符(图 6)。测序结果显示,扩增的目的基因与 NDRV 的 P18 蛋白基因序列一致,表明分离的 5 株病毒均为 NDRV。



M: DNA marker 2 000; 1~5: 样品 1~样品 5; 6: 阳性对照; 7: 阴性对照。

图 6 NDRV 分离株荧光定量 RT-PCR 扩增结果

Fig.6 Fluorescence quantitative RT-PCR amplification results of novel duck reovirus(NDRV) isolates

2.9 人工感染雏鸭试验结果

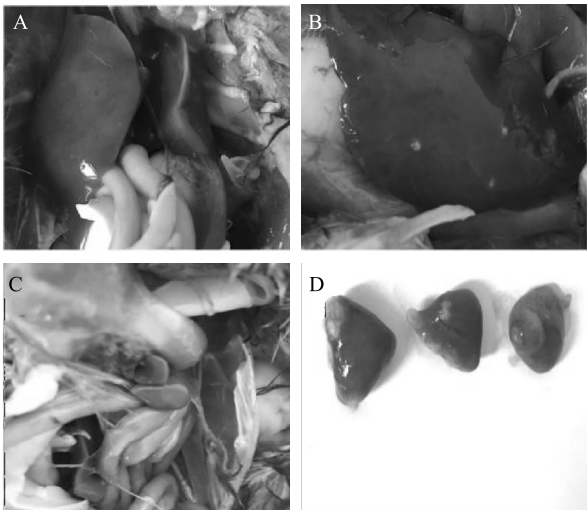
NDRV SY 株人工感染健康雏鸭后第 7 d,从试

表 1 荧光定量 RT-PCR 检测组内、组间重复性试验结果

Table 1 Intra-group and inter-group reproducibility test results of fluorescence quantitative RT-PCR

质粒标准 品含量 (拷贝, 1 μl)	组内变异试验		组间变异试验	
	平均数	变异系数 (%)	平均数	变异系数 (%)
1×10 ⁵	7.30±0.01	0.10	7.30±0.01	0.10
1×10 ⁴	15.70±0.07	0.40	15.65±0.01	0.07
1×10 ³	23.66±0.07	0.30	23.69±0.06	0.20

验组和对照组中,随机选择 9 只雏鸭剖检。结果显示,试验组雏鸭肝脏肿大,有灰白色坏死点或出血斑;脾脏表面出现核桃皮状、小米粒至绿豆粒大小的不规则坏死灶(图 7)。对照组肝、脾均无明显病变(图 7)。



A: 健康肝; B: 坏死肝; C: 健康脾; D: 坏死脾。

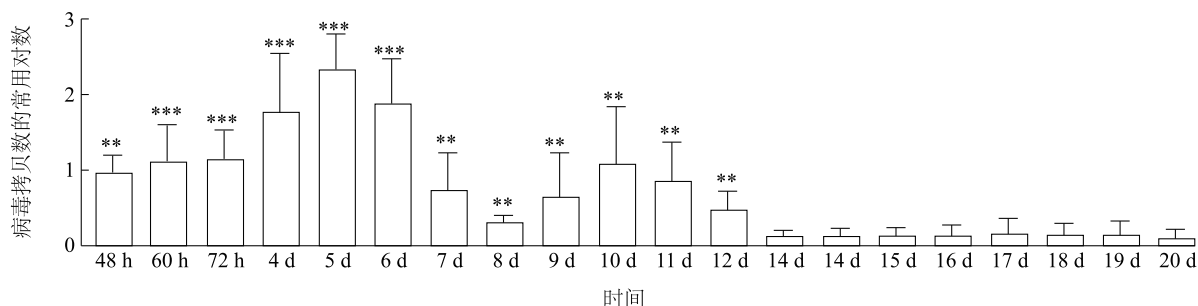
图 7 雏鸭 NDRV SY 株人工感染试验组和对照组器官病变

Fig.7 Organ lesions of ducklings infected artificially with the NDRV SY strain in experimental group and control group

用建立的荧光定量 RT-PCR 检测方法对采集的雏鸭泄殖腔肛拭子样品进行检测,得到每只雏鸭各时间段样品的 Ct 值,用标准曲线方程计算得出其对

应的病毒拷贝数常用对数值,并计算各时间段平均值和标准差,绘制排毒规律曲线图。如图 8 所示,试验组 NDRV SY 株感染鸭从第 2 d(48 h)开始排毒,随后排毒量不断增加;第 5 d 达到第 1 个排毒高峰,病毒拷贝数为 $1 \mu\text{l}$ 1.42×10^2 拷贝;第 6~8 d,排毒量

显著减少,出现一个短暂的降低;从第 9 d 起感染鸭排毒量又一次增加,第 10 d 形成第 2 个小高峰,病毒拷贝数为 $1 \mu\text{l}$ 1.42×10^1 拷贝;个体排毒过程一直持续到第 20 d 左右,对照组均未检出病毒。



48 h~7 d 病毒载量为 15 只雏鸭肛拭子病毒拷贝数的平均值,每个样品 3 次重复;8~20 d 病毒载量为 6 只雏鸭肛拭子病毒拷贝数的平均值,每个样品 3 次重复,结果用平均值±标准差表示,*、**表示每个时间点人工感染组病毒拷贝数与对照组之间差异达 0.05 和 0.01 显著水平。

图 8 雏鸭感染 NDRV SY 株排毒趋势图

Fig.8 Detoxification trend diagram of ducklings infected with NDRV SY strain

3 讨论

NDRV、MDRV 和 ADV 都是禽呼肠孤病毒,生物学特征表现基本相同,但是临床和抗原性表现存在较大的差异^[17]。NDRV 可感染各种鸭,不仅能引起雏鸭发病和死亡,还能引起免疫抑制和生长发育障碍,为 NDRV 的防控带来极大的困难。因而,建立一种特异性强、灵敏度高的快速检测方法对准确检测 NDRV 十分重要。荧光定量 RT-PCR 检测灵敏度高于普通 RT-PCR,通常高 100 倍以上。张博等^[18]根据 NDRV σB 基因的序列保守区,建立了 TaqMan 探针实时荧光定量 RT-PCR 检测方法。以 NDRV 特有的非结构蛋白 P18 基因为检测靶基因,该基因能将 NDRV 与 MDRV 和其他禽呼肠孤病毒区别开来^[11-13]。P18 蛋白还是病毒感染初期就表达的蛋白,参与病毒的复制。因此,针对 NDRV P18 蛋白基因进行检测,有利于该病的早期诊断。

建立的荧光定量 RT-PCR 检测方法灵敏度高,最低检测限为 $1 \mu\text{l}$ 1.42×10^1 拷贝的模板,与张博等^[18]建立的荧光定量 RT-PCR 检测方法的敏感性相同;比常规的 RT-PCR 检测方法灵敏 1 000 倍^[16];熔解曲线结果显示,所扩增产物的 T_m 值基本相同,扩增特异性好;与其他常见鸭源性病毒无交叉反应,说明该方法具有很强的特异性;组内和组间的变异

系数小于 0.5%,表明该方法重复性好。对临床样品的检测中发现,本荧光定量 RT-PCR 检测方法的阳性检出率为 23.85%,高于普通 RT-PCR 检测方法的 17.57%,且二者的检测符合率为 93.7%。随机选 5 份经荧光定量 RT-PCR 检测方法检出为阳性的样品接种 SPF 鸭胚进行病毒分离培养,对各自收获的鸭胚尿囊液用 NDRV 特有 P18 蛋白基因序列设计的引物进行 PCR 扩增,均扩增出预期大小的目的基因片段,基因测序结果显示与 NDRV 的 P18 蛋白基因序列一致,证明分离的 5 株病毒均为 NDRV。试验结果表明,建立的荧光定量 RT-PCR 检测方法更适合 NDRV 快速诊断和流行病学调查。

NDRV SY 株是由本实验室从江苏省沭阳县采集并分离鉴定的强毒株^[19]。用该毒株人工感染雏鸭动物试验中,利用 NDRV 荧光定量 RT-PCR 检测方法对收集的 624 份鸭肛拭子 cDNA 样品(312 份为 NDRV 人工感染麻鸭试验组肛拭子 cDNA,312 份为健康雏鸭肛拭子 cDNA)进行检测。结果显示,试验组 NDRV-SY 株感染鸭从第 2 d(48 h)开始排毒,第 5 d 达到第 1 个排毒高峰,从第 9 d 起感染鸭排毒量又一次增加,第 10 d 形成第 2 个小高峰,排毒期一直持续到 20 d 左右,这可能与 NDRV 在宿主体内的感染与复制有关。试验组雏鸭在攻毒后第 5 d 开始出现肝脏、脾脏坏死,在攻毒后第 7 d 肝脏、脾

脏病变最为明显,这与人工感染雏鸭排毒高峰期和变化趋势相符合。

因此,本研究基于 NDRV P18 蛋白基因成功建立了 NDRV 荧光定量 RT-PCR 检测方法,该方法适用于 NDRV 感染的排毒监测以及临床感染的快速诊断和流行病学调查。

参考文献:

- [1] 胡奇林,陈少莺,林锋强,等.番鸭呼肠孤病毒的鉴定[J].病毒学报,2004,20(3):242-248.
- [2] 黄瑜,程龙飞,李文杨,等.雏半番鸭呼肠孤病毒的分离与鉴定[J].中国兽医学报,2004,24(1):14-15.
- [3] 陈少莺,陈仕龙,林锋强,等.一种新的鸭病(暂名鸭出血性坏死性肝炎)病原学研究初报[J].中国农学通报,2009,25(16):28-31.
- [4] 刘鸿,陆新浩,任祖伊,等.番鸭“新肝病”在浙江的流行情况及防控措施[J].浙江畜牧兽医,2010,35(6):26-28.
- [5] 陈少莺,陈仕龙,林锋强,等.新型鸭呼肠孤病毒的分离与鉴定[J].病毒学报,2012,28(3):224-230.
- [6] 陈宗艳,朱英奇,王世传,等.一株新型鸭源呼肠孤病毒(TH11株)的分离与鉴定[J].中国动物传染病学报,2012,20(1):10-15.
- [7] 焦哲,宋彦民,孙秀秀,等.鸭疫里默氏杆菌与鸭源呼肠孤病毒混合感染的病理学诊断[J].中国兽医科学,2019,49(9):1194-1198.
- [8] 龔淑楠,徐海军,范潇会,等.一例雏番鸭大肠杆菌和呼肠孤病毒混合感染的诊治[J].中国动物保健,2020,22(10):44-45.
- [9] 陈海鹏,云涛,张存,等.新型番鸭呼肠孤病毒 σ C 蛋白的原核表达及其抗原特性[J].浙江农业学报,2014,26(6):1448-1452.
- [10] YUN T, HUA J G, YE W C, et al. Comparative proteomic analysis revealed complex responses to classical/novel duck reovirus infections in *Caima moschata*[J]. Scientific Reports, 2018,8(1):10079.
- [11] MA G, WANG D, SHI J, et al. Complete genomic sequence of reovirus isolate from Pekin ducklings in China[J]. J Virol, 2012, 86:13137.
- [12] WANG D, XU F, MA G, et al. Complete genomic sequence of a new Muscovy duck-origin reovirus from China[J]. J Virol, 2012, 86:12445.
- [13] 吴巧梅.水禽呼肠孤病毒 p18 蛋白鉴定及其反向遗传操作平台的建立[D].北京:中国农业科学院,2017.
- [14] 吴巧梅,李传峰,朱杰,等.新型鸭呼肠孤病毒 P18 基因的表达与鉴定[C]//中国畜牧兽医学会兽医公共卫生学分会.中国畜牧兽医学会兽医公共卫生学分会第五次学术研讨会论文集.通辽:中国畜牧兽医学会兽医公共卫生学分会,2016.
- [15] DU X, DING M, WU Q, et al. Characterization of a P18 protein in the S1 segment of the novel duck reovirus genome[J]. Acta Virologica, 2020,64(1):59-66.
- [16] 云涛,张存,华炯钢,等.鸭呼肠孤病毒基因 I 型与 II 型鉴别诊断 RT-PCR 方法的建立与应用[J].农业生物技术学报,2016,24(12):1964-1972.
- [17] 王锡堃,唐秀英,刘庆祥,等.应用琼扩试验检查鸡病毒性关节炎[J].家畜传染病,1985(3):26-27.
- [18] 张博,陈立功,武华,等.新型鸭呼肠孤病毒 Taq Man 探针实时荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立与应用[J].河北农业大学学报,2020,43(5):80-84.
- [19] 晁锦,卢凤英,潘群兴,等.新型鸭呼肠孤病毒 SY 株的分离鉴定及培养特性[J].中国动物传染病学报,2020,28(3):1-8.

(责任编辑:张震林)