

杨振兴, 李占鸿, 肖雷, 等. 蓝舌病病毒、流行性出血病病毒和帕利亚姆血清群病毒三重 RT-qPCR 检测方法的建立及应用 [J]. 华南农业大学学报, 2021, 42(3): 17-25.
YANG Zhenxing, LI Zhanhong, XIAO Lei, et al. Establishment and application of triplex RT-qPCR for detection of bluetongue virus, epizootic hemorrhagic disease virus and Palyam serogroup virus[J]. Journal of South China Agricultural University, 2021, 42(3): 17-25.

蓝舌病病毒、流行性出血病病毒和帕利亚姆血清群病毒三重 RT-qPCR 检测方法的建立及应用

杨振兴[†], 李占鸿[†], 肖雷, 谢佳芮, 廖德芳, 李卓然, 李华春, 朱建波, 杨恒
(云南省畜牧兽医科学院/云南省热带亚热带动物病毒病重点实验室, 云南 昆明 650224)

摘要:【目的】建立蓝舌病病毒 (Bluetongue virus, BTV)、流行性出血病病毒 (Epizootic hemorrhagic disease virus, EHDV) 及帕利亚姆血清群病毒 (Palyam serogroup virus, PALV) 快速筛查和诊断的三重 RT-qPCR 检测技术。【方法】选择 BTV 的 *NS3*、EHDV 的 *NS1* 以及 PALV 的 *VP7* 基因作为靶基因, 设计 3 组特异性引物和探针, 建立 3 种病毒的三重 RT-qPCR 检测方法。对检测方法的灵敏度、特异性和重复性进行验证, 同时使用我国分离的 BTV、EHDV 与 PALV 不同血清型毒株和对应的阳性血液样本, 与 24 个 BTV 血清型及 6 个 EHDV 血清型参考毒株对该三重法的检测效果进行验证。【结果】三重 RT-qPCR 的扩增效率均可达 90% 以上, 对 3 种病毒核酸拷贝数的检测下限均为 10 μL⁻¹ 级别, 与单重法的检测灵敏度相当; 与阿卡斑病毒、小反刍兽疫病毒、口蹄疫病毒和牛流行热病毒之间无交叉反应; Ct 值批内、批间变异系数均在 2% 以内; 可检测出 24 种 BTV 血清型、6 种 EHDV 血清型与 3 种 PALV 血清型, 具有群特异性; 可有效检测血液中的病毒核酸, 检测结果与单重法一致。【结论】本研究建立的 BTV、EHDV 与 PALV 三重 RT-qPCR 具有良好的敏感性、特异性和重复性, 可用于临床样本中对 3 种病毒的同时诊断与筛查。

关键词: 三重 RT-qPCR; 蓝舌病病毒; 流行性出血病病毒; 帕利亚姆血清群病毒; 病毒检测
中图分类号: S852.65 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-411X(2021)03-0017-09

Establishment and application of triplex RT-qPCR for detection of bluetongue virus, epizootic hemorrhagic disease virus and Palyam serogroup virus

YANG Zhenxing[†], LI Zhanhong[†], XIAO Lei, XIE Jiarui, LIAO Defang,
LI Zhuoran, LI Huachun, ZHU Jianbo, YANG Heng
(Yunnan Veterinary and Animal Science Institute/Yunnan Tropical and Subtropical Animal
Virus Disease Laboratory, Kunming 650224, China)

Abstract: 【Objective】To establish triplex RT-qPCR detection technique for rapid screening and diagnosis of bluetongue virus (BTV), epizootic hemorrhagic disease virus (EHDV) and Palyam serogroup virus (PALV) infection. 【Method】*NS3* gene of BTV, *NS1* gene of EHDV and *VP7* gene of PALV were used as target genes to design three sets of primers and probes for the establishment of a triplex RT-qPCR assay. The sensitivity,

收稿日期: 2020-07-22 网络首发时间: 2021-04-01 17:09:30
网络首发地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20210401.1651.002.html>
作者简介: 杨振兴 (1986—), 男, 助理研究员, 硕士, E-mail: s300yn@163.com; 李占鸿 (1989—), 男, 助理研究员, 硕士, E-mail: dy081lzh@163.com; [†]表示同等贡献; 通信作者: 朱建波 (1970—), 男, 研究员, 硕士, E-mail: zhujb70@126.com; 杨恒 (1978—), 男, 研究员, 博士, E-mail: yangheng2008.cool@163.com
基金项目: 国家自然科学基金 (31760744); 国家重点研发计划 (2016YFD0500908, 2017YFC1200505); 云南省中青年学术和技术带头人后备人才培养项目 (2017HB055)

specificity and repeatability of this assay were evaluated, meanwhile different BTV, EHDV, PALV serotype strains isolated in China and their corresponding positive blood samples, as well as reference strains of 24 BTV serotypes and six EHDV serotypes were used to verify detection effects of the assay. 【Result】 The amplification efficiencies of the triplex RT-qPCR assay were all more than 90%, and the copy number detection limits of *in vitro* transcribed ssRNAs were all low to 10 μL^{-1} , which was equivalent to those of single plex RT-qPCR assay for each virus. There was no cross reaction with akabane virus, peste des petits ruminants virus, foot-and-mouth disease virus and bovine ephemeral fever virus. The intra-assay and inter-assay variable coefficients of Ct value were all less than 2%. The established triplex RT-qPCR successfully detected viral strains belonging to 24 BTV serotypes, six EHDV serotypes and three PALV serotypes, indicating that this assay possessed remarkable group specificity. The established triplex RT-qPCR assay could effectively detect the positive blood samples collected from animals infected by BTV, EHDV and PALV, and the results were consistent with those of monoplex RT-qPCR assay. 【Conclusion】 The triplex RT-qPCR detection assay for BTV, EHDV and PALV has good sensitivity, specificity and repeatability, and can be used for the simultaneous diagnosis and screening of these three viruses in clinical samples.

Key words: triplex RT-qPCR; bluetongue virus; epizootic hemorrhagic disease virus; Palyam serogroup virus; virus detection

蓝舌病病毒 (Bluetongue virus, BTV)、流行性出血病病毒 (Epizootic hemorrhagic disease virus, EHDV) 和帕利亚姆血清群病毒 (Palyam serogroup virus, PALV) 均为通过库蠅 *Culicoides* 传播的呼肠孤病毒科 Reoviridae 环状病毒属 *Orbivirus* 成员, 广泛分布于热带、亚热带与温带地区, 牛是 3 种病毒的重要宿主^[1-3]。BTV、EHDV 和 PALV 在全球引起的动物疫病的暴发和流行给牛羊养殖业造成了严重经济损失, 导致牛羊进出口贸易受限, 影响了国际畜产品正常贸易。据估计, 2009 年全球畜牧业仅因 BTV 引发蓝舌病而导致的经济损失就高达 30 亿美元^[4]; 近年来 EHDV 在中东多国特别是在阿尔及利亚、突尼斯、摩洛哥和以色列等国家的牛群中多次引发流行性出血病的暴发, 严重影响了当地畜牧业的健康发展^[5]; PALV 感染妊娠期母牛能引起新生犊牛积水性无脑和小脑发育不全, 曾在日本和韩国暴发, 给两国的肉牛养殖业造成了严重的经济损失^[6]。目前, 蓝舌病和流行性出血病已经被世界动物卫生组织 (Office international des epizooties, OIE) 列为法定报告的跨境动物疫病。

BTV、EHDV 和 PALV 血清型众多, 目前世界范围内已发现 27 种 BTV 血清型^[7]、9 种 EHDV 血清型^[8] 和 10 种 PALV 血清型^[9]。2013 年在公益性行业 (农业) 科研专项的资助下, 在全国范围内开展了虫媒病毒的流行病学调查, 发现我国主要流行 12 种 BTV 血清型 (BTV-1、-2、-3、-4、-5、-7、-9、-12、-15、-16、-21 和 -24)^[10], 5 种 EHDV 血清型 (EHDV-1、-5、-6、-7 和 -10)^[11] 和 3 种 PALV 血清型

[Chuzan disease virus (CHUV)、D'Aguilar virus (DAV) 与 Bunyip Creek virus (BCV)]^[12] 等, 表明流行于我国的 BTV、EHDV 和 PALV 血清型具有丰富多样性。对 3 种病毒的血清学调查发现, 我国至少 12 个省区的牛羊群中同时存在 BTV、EHDV 和 PALV 抗体阳性, 且阳性率由北向南逐渐升高, 特别是在南方地区, 如云南、广西和广东等地的牛群中, 3 种病毒的血清抗体阳性率均高于 30%; 说明 BTV、EHDV 和 PALV 在我国已经广泛存在, 严重威胁我国畜牧产业的健康发展^[13-15]。

快速诊断病原是动物疫病防控的重要一环, BTV、EHDV 和 PALV 不仅具有共同的传播媒介与易感动物, 在流行区域上也存在重叠; 因此, 建立一种能同时诊断这 3 种病原的检测方法具有重要的应用价值。多重 RT-qPCR 可在 1 个反应管中同时检测多种目的基因, 克服了普通荧光 PCR 只能检测单一基因的缺点, 具有特异性强、敏感性高和短时间内检测多种病原的优点, 被广泛应用于动物传染病的诊断^[16]。本研究旨在运用 TaqMan 探针技术建立一种三重 RT-qPCR 方法, 提高病毒检出率, 简化操作流程, 降低检测成本, 为临床快速鉴别检测 BTV、EHDV 和 PALV 提供有效的技术手段。

1 材料与方法

1.1 毒株、血液和核酸样品

24 个 BTV 血清型 (BTV-1~BTV-24) 南非参考毒株由 OIE 南非蓝舌病参考实验室 (Onderstepoort Veterinary Institute) 提供, 6 个 EHDV 血清型

(EHDV-1、-2、-5、-6、-7、-8) 参考毒株由澳大利亚麦克阿瑟·伊丽莎白农业研究所 (Elizabeth Macarthur Agricultural Institute, EMAI) 提供, 中国分离的 12 种 BTV 血清型、5 种 EHDV 血清型和 3 种 PALV 血清型代表毒株信息见表 1。阿卡斑病毒 (Akabane virus, AKAV) 核酸由云南省畜牧兽医科学院热带亚热带动物病毒病重点实验室保存, 小反刍兽疫病毒 (Peste des petits ruminants virus, PPRV) 核酸由中国

农业科学院哈尔滨兽医研究所惠赠, 口蹄疫病毒 (Foot-and-mouth disease virus, FMDV)、牛流行热病毒 (Bovine ephemeral fever virus, BEFV) 核酸由中国农业科学院兰州兽医研究所惠赠。BTV Seg-10、EHDV Seg-5 和 PALV Seg-7 基因节段重组质粒 pLB-BTV-NS3-T7、pLB-EHDV-NS1-T7 和 pLB-CHUV-VP7-T7 由云南省畜牧兽医科学院热带亚热带动物病毒病重点实验室前期制备并保存。

表 1 中国分离的不同蓝舌病病毒、流行性出血病病毒和帕利亚姆血清群病毒血清型代表毒株信息
Table 1 Representative strains of different serotypes of bluetongue virus, epizootic hemorrhagic disease virus and Palyam serogroup virus isolated in China

血清型 Serotype	毒株 Strain	分离年份 Isolation year	分离地点 Isolation place	来源动物 Animal source
BTV-1	V147	2012	云南师宗 Shizong, Yunnan	绵羊 Sheep
BTV-2	V146	2013	云南普洱 Puer, Yunnan	黄牛 Cattle
BTV-3	V025	2013	云南德宏 Dehong, Yunnan	黄牛 Cattle
BTV-4	V030	2013	云南普洱 Puer, Yunnan	黄牛 Cattle
BTV-5	V084	2012	云南师宗 Shizong, Yunnan	黄牛 Cattle
BTV-7	V089	2014	广东汕头 Shantou, Guangdong	黄牛 Cattle
BTV-9	V008	2013	云南德宏 Dehong, Yunnan	黄牛 Cattle
BTV-12	V007	2012	广西南宁 Nanning, Guangxi	黄牛 Cattle
BTV-15	V061	2014	云南普洱 Puer, Yunnan	黄牛 Cattle
BTV-16	V109	2012	云南师宗 Shizong, Yunnan	绵羊 Sheep
BTV-21	V057	2013	江苏须臾 Xuyu, Jiangsu	黄牛 Cattle
BTV-24	V015	2013	云南德宏 Dehong, Yunnan	黄牛 Cattle
EHDV-1	V128	2013	广东汕头 Shantou, Guangdong	奶牛 Cow
EHDV-5	V127	2015	广西融水 Rongshui, Guangxi	水牛 Buffalo
EHDV-6	V274	2014	云南普洱 Puer, Yunnan	黄牛 Cattle
EHDV-7	V296	2013	云南师宗 Shizong, Yunnan	水牛 Buffalo
EHDV-10	V280	2017	云南师宗 Shizong, Yunnan	黄牛 Cattle
CHUV	V144	2012	云南师宗 Shizong, Yunnan	黄牛 Cattle
DAV	V157	2015	云南红河 Honghe, Yunnan	水牛 Buffalo
BCV	V252	2016	广东汕头 Shantou, Guangdong	奶牛 Cow

1.2 主要试剂与仪器

病毒 RNA 抽提试剂盒 MagMAX-96 Viral RNA Isolation Kit 购自 Thermo 公司, DNA 胶回收试剂盒、荧光定量 PCR 试剂盒购自宝生物工程 (大连) 有限公司, T7 启动子 RNA 体外转录试剂盒购自 Promega 公司, RNA 纯化试剂盒、质粒 DNA 提取试剂盒、pLB 平末端克隆载体购自天根生化科技有限公司, 7500 实时荧光定量 PCR 系统购自 ABI 公司。

1.3 引物和探针的设计与合成

从 NCBI 检索并下载 BTV、EHDV、PALV 病毒的全基因组序列, 并根据云南省畜牧兽医科学院热带亚热带动物病毒病重点实验室分离的 3 种病毒的全基因组序列, 利用 MEGA-X 进行序列对比分析, 确定并选择 BTV NS3、EHDV NS1 和 PALV VP7 基因保守区序列, 利用 Primer Express 6.0 软件设计

相应的特异性引物, 分别用 FAM、VIC 和 TAMRA 荧光基团标记 TaqMan 探针, 使用 BHQ1 作为淬灭基团 (表 2)。引物和探针均由宝生物工程 (大连) 有限公司合成, 并用 RNase-free 水稀释至 20 μmol/L。

1.4 标准品的制备

提取 pLB-BTV-NS3-T7、pLB-EHDV-NS1-T7 和 pLB-CHUV-VP7-T7 基因序列重组质粒, 使用 Xba I 内切酶进行质粒的酶切线性化。取 1 μg 纯化后的 DNA 作为模板, 使用 T7 体外转录试剂盒进行 BTV Seg-10 (822 bp)、EHDV Seg-5 (533 bp) 和 PALV Seg-7 (950 bp) ssRNA 的体外转录, 反应体系为: DNA 模板 5 μL、RiboMAX™ Express T7 2× Buffer 10 μL、T7 Express Enzyme Mix 2 μL, 加入 RNase-free 水补齐至 20 μL; 37 °C 反应 30 min。使用 RNA 纯化试剂盒纯化转录产物, Nanodrop ND-

表 2 蓝舌病病毒、流行性出血病病毒和帕利亚姆血清群病毒三重 RT-qPCR 的引物与探针

Table 2 Primers and probes used for detecting bluetongue virus, epizootic hemorrhagic disease virus and Palyam serogroup virus by triplex RT-qPCR

引物/探针 Primer/Probe	扩增或标记位置 Amplification or label location	扩增或标记长度/bp Amplification or label length	引物或探针序列(5'→3') Primer or probe sequence
BTV-NS3-F	Seg-10	189~207	TGGAYAAAGCGATGTCAAA
BTV-NS3-R	Seg-10	266~285	ACATCATCACGAAACGCTTC
BTV-NS3-Probe	Seg-10	243~264	FAM-ARGCTGCATTTCGCATCGTACGC-BHQ1
EHDV-NS1-F	Seg-5	12~32	TCTTCGTCGACTGCCATCGAG
EHDV-NS1-R	Seg-5	66~94	AACATTTTGACATGATTGKCRTARTAACT
EHDV-NS1-Probe	Seg-5	34~63	TAMRA-TGGAGCGCTTTTGTAGAAAATACAACATGA-BHQ1
PALV-VP7-F	Seg-7	275~295	CATCAATGGCAACAATCGGTG
PALV-VP7-R	Seg-7	346~369	ATTCAGCATACCTGTAATTCGTAC
PALV-VP7-Probe	Seg-7	314~341	VIC-TTCCATATACAACGTCGGCAATGACAAG-BHQ1

2000 测定核酸浓度后,根据相对分子质量计算纯化后 ssRNA 的拷贝数。

1.5 三重 RT-qPCR 反应条件的优化

以体外转录的 BTV Seg-10、EHDV Seg-5 和 PALV Seg-7 的 ssRNA 为模板,采用方阵法分别对三重 RT-qPCR 方法的引物浓度 (0.1~0.5 μmol·L⁻¹)、探针浓度 (0.1~0.8 μmol·L⁻¹)、退火温度 (50~60 ℃) 和模板体积 (2~8 μL) 进行筛选,确定最佳反应条件。

1.6 特异性试验

以制备好的 BTV Seg-10、EHDV Seg-5 和 PALV Seg-7 的 ssRNA 模板作为阳性对照,与 AKAV、PPRV、FMDV 和 BEFV 核酸一同进行三重 RT-qPCR 检测,设立阴性牛羊血液总 RNA 及 DEPC 水分别作为阴性和空白对照,重复 3 次。

1.7 敏感性试验和标准曲线的绘制

分别将 3 种病毒的体外转录 ssRNA 以 10 倍梯度稀释获得拷贝数为 1×10¹⁰~1×10⁻¹ μL⁻¹ 的 12 个梯度,分别以阴性牛羊血液总 RNA 及 DEPC 水作为阴性和空白对照。所有样品及对照均设 2 个复孔,同时进行单重和三重 RT-qPCR 检测,并以 RNA 浓度的对数值为横坐标、三重 RT-qPCR 结果 Ct 值为纵坐标绘制标准曲线。

1.8 重复性试验

以 BTV、EHDV 和 PALV 体外转录的 ssRNA 的 3 个稀释度 (拷贝数分别为 1×10³、1×10⁵ 和 1×10⁷ μL⁻¹) 为模板,每个稀释度各取 10 份样本分别在不同的时间重复检测 3 次,同时设立阴性牛羊血液总 RNA 及 DEPC 水分别作为阴性和空白对照,并通过计算 Ct 值的标准差和变异系数,验证三重 RT-qPCR 的批内和批间重复性。

1.9 混合病毒核酸样品的检测试验

将 BTV、EHDV 和 PALV 3 种病毒高、中、低

浓度 (拷贝数分别为 1×10⁶、1×10⁴ 和 1×10² μL⁻¹) 的 ssRNA 分别按体积比 1:1 混合,同时进行单重和三重 RT-qPCR 检测,并设立阴性牛羊血液总 RNA 及 DEPC 水分别作为阴性和空白对照。在 3 种病毒核酸混合的情况下分析高浓度的核酸模板是否会影响三重 RT-qPCR 对低浓度核酸模板的检测结果。

1.10 毒株与临床血液样本的检测

提取 2012—2016 年在我国分离的 BTV、EHDV 和 PALV 不同血清型毒株及已分离毒株对应的阳性血液样本核酸,与 24 个 BTV 血清型及 6 个 EHDV 血清型参考毒株的核酸同时进行单重和三重 RT-qPCR 检测。比较试验结果,分析和评价该方法的临床实用性。

2 结果与分析

2.1 标准品的制备

以构建好的 3 种重组质粒为模板进行体外转录,获得 BTV Seg-10 (822 bp)、EHDV Seg-5 (533 bp) 和 PALV Seg-7 (950 bp) 的 ssRNA,经纯化后测定质量浓度分别为 656.5、408.6 和 785.7 ng·μL⁻¹,计算获得拷贝数分别为 1.41×10¹²、1.36×10¹² 和 1.46×10¹² μL⁻¹。将获得的 ssRNA 样品作为三重 RT-qPCR 灵敏性评价的标准品。

2.2 三重 RT-qPCR 方法的建立与优化

通过引物和探针浓度的不同配比试验及反应条件的优化试验,最终确定反应体系。总反应体积为 20 μL,其中 2× One Step RT-PCR Buffer III 10 μL, Ex Taq HS (5 U·μL⁻¹) 0.4 μL, PrimeScript RT Enzyme Mix II 0.4 μL, Rox Reference Dye II (50×) 0.4 μL, BTV 上、下游引物各 0.2 μL 及探针 0.4 μL, EHDV 的上、下游引物各 0.3 μL 及探针 0.6 μL, PALV 上、下游引物各 0.2 μL 及探针 0.4 μL,变性模板

RNA 4 μL , 双蒸水补充至 20 μL 。反应条件: 42 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 92 $^{\circ}\text{C}$ 10 s; 92 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 34 s, 40 个循环。

2.3 特异性试验

将 3 种病毒体外转录 ssRNA 作为阳性对照, 同时对 AKAV、PPRV、FMDV 和 BEFV 的核酸及阴性对照进行三重 RT-qPCR 检测。结果 (图 1) 显示, 本研究建立的三重 RT-qPCR 具有高度特异性, 仅与对应的 BTV、EHDV 和 PALV 核酸产生扩增曲线, 其他病原 (AKAV、PPRV、FMDV、BEFV) 和阴性对照均无扩增曲线, 判定为阴性。

2.4 敏感性试验和标准曲线的绘制

以拷贝数为 $1\times 10^{10}\sim 1\times 10^{-1}\mu\text{L}^{-1}$ 的 12 个梯度 ssRNA 作为模板, 根据已优化的条件同时进行三重和单重 RT-qPCR 反应。结果显示, 所有阴性对照及

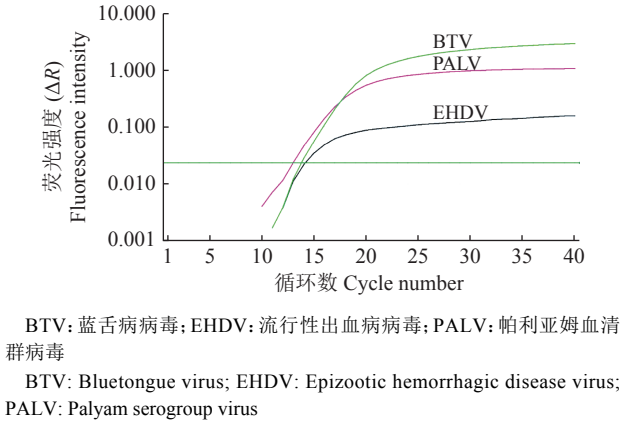
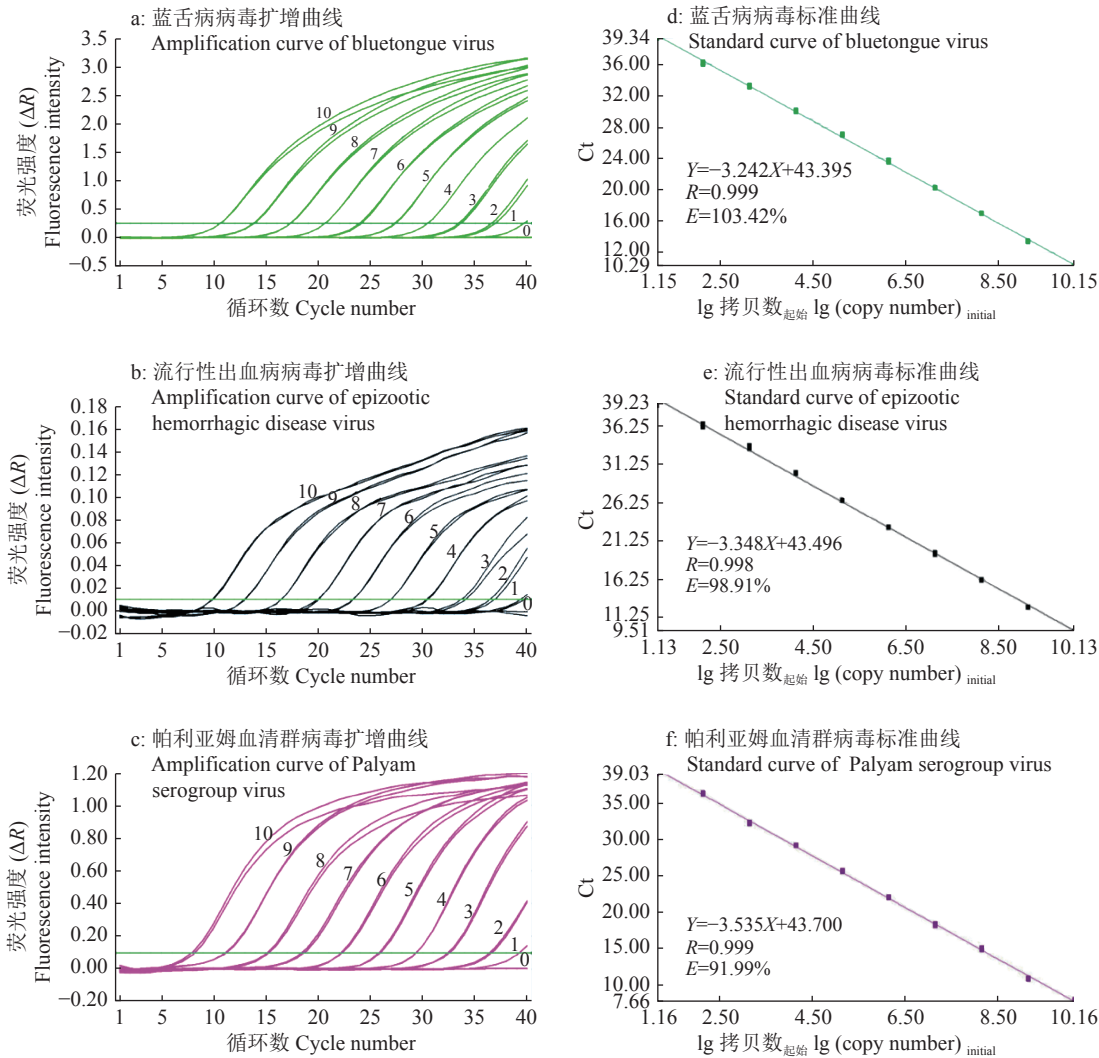


图 1 三重 RT-qPCR 特异性试验
Fig. 1 Specificity test of triplex RT-qPCR

空白对照均无阳性扩增 (图 2a、2b、2c); 在核酸拷贝数为 $1\times 10^{10}\sim 1\times 10^1\mu\text{L}^{-1}$ 的范围内, 标准曲线均具有



曲线上数字 0~10 分别代表 ssRNA 拷贝数为 $1\times 10^0\sim 1\times 10^{10}\mu\text{L}^{-1}$
The numbers from 0 to 10 on the curves indicate ssRNA copy numbers of $1\times 10^0\sim 1\times 10^{10}\mu\text{L}^{-1}$ respectively
图 2 蓝舌病毒、流行性出血病病毒和帕利亚姆血清群病毒体外转录 ssRNA 对三重 RT-qPCR 灵敏性评价
Fig. 2 Sensitivity evaluation of bluetongue virus, epizootic hemorrhagic disease virus and Palyam serogroup virus *in vitro* transcribed ssRNA to triplex RT-qPCR

良好的线性, 相关系数 (R) 均在 0.998 以上, 引物扩增效率 (E) 为 91.99%~103.42%(图 2d、2e、2f)。各浓度体外转录 ssRNA 单重与三重 RT-qPCR 检测的 Ct 均值 (表 3) 表明本研究建立的三重 RT-qPCR 最低可检测到拷贝数为 $1\times 10^1\ \mu\text{L}^{-1}$ 的 BTV、EHDV 和 PALV 核酸, 与单重检测结果一致。

表 3 单重和三重 RT-qPCR 方法 Ct 值比较¹⁾
Table 3 Ct value comparison between monoplex and triplex RT-qPCR

核酸拷贝数/ μL^{-1} Nucleic acid copy number	蓝舌病病毒 Bluetongue virus		流行性出血病病毒 Epizootic hemorrhagic disease virus		帕利亚姆血清群病毒 Palyam serogroup virus							
	单重	Monoplex	三重	Triplex	单重	Monoplex	三重	Triplex				
1×10^{10}		8.57		9.00		9.05		9.15		6.47		6.80
1×10^9		11.63		12.17		12.23		12.26		9.22		9.20
1×10^8		15.43		15.72		15.71		15.76		13.75		13.45
1×10^7		18.83		19.11		19.35		19.04		16.83		17.05
1×10^6		22.30		22.34		22.59		22.48		20.92		21.01
1×10^5		25.40		25.75		26.15		26.12		24.59		24.55
1×10^4		28.50		28.87		29.47		29.59		28.09		28.13
1×10^3		31.75		32.10		32.65		33.17		31.03		30.96
1×10^2		34.38		35.04		35.51		36.03		34.28		34.61
1×10^1		37.78		38.11		38.28		38.64		37.48		37.66
1×10^0		—		—		—		—		—		—
1×10^{-1}		—		—		—		—		—		—

1) “—” 表示未检测出
1) “—” indicates not detectable

2.5 混合病毒核酸样品的检测

将 BTV、EHDV 和 PALV 3 种病毒的 ssRNA 分别按高、中、低 3 个浓度等体积混合, 同时进行单重和三重 RT-qPCR 检测。结果 (表 4) 显示, 一种病毒核酸模板浓度较高 (拷贝数为 $10^6\ \mu\text{L}^{-1}$) 而另一种病毒核酸模板浓度较低 (拷贝数为 $10^2\ \mu\text{L}^{-1}$) 时, 三重 RT-qPCR 依然可以同时检测到 3 种病毒, 并且与单重 RT-qPCR 结果无明显差异。

表 4 混合病毒核酸样品单重和三重 RT-qPCR 检测结果
Table 4 Results of mixed virus nucleic acid samples detected by monoplex and triplex RT-qPCR

样品 Sample	病毒 ¹⁾ Virus	核酸拷贝数/ μL^{-1} Nucleic acid copy number	Ct	
			单重 Monoplex	三重 Triplex
1	BTV	1×10^6	23.20	23.24
	EHDV	1×10^4	30.45	30.57
	PALV	1×10^2	35.33	35.66
2	BTV	1×10^4	29.48	29.85
	EHDV	1×10^2	37.01	37.08
	PALV	1×10^6	21.82	21.91
3	BTV	1×10^2	35.43	36.09
	EHDV	1×10^6	23.49	23.38
	PALV	1×10^4	29.07	29.11

1) BTV: 蓝舌病病毒; EHDV: 流行性出血病病毒; PALV: 帕利亚姆血清群病毒
1) BTV: Bluetongue virus; EHDV: Epizootic hemorrhagic disease virus; PALV: Palyam serogroup virus

2.6 重复性试验

以高、中、低 3 个稀释度的 BTV、EHDV 和 PALV 的 ssRNA 作为模板, 分 3 个批次进行检测, 每批次每个稀释度各 10 份样本, 通过计算批内、批间变异系数评价多重体系的稳定性。结果 (表 5) 显示, BTV、EHDV 和 PALV 病毒核酸高中低 3 个浓度所对应的批内和批间 Ct 值的标准差均在 0.5 以内, 变异系数均在 2% 以下, 可见三重体系对于 3 种病毒核酸的检测均具有良好的稳定性。

表 5 三重 RT-qPCR 重复性试验中 Ct 值与变异系数
Table 5 Means and coefficients of variation in repeatability tests of triplex RT-qPCR

病毒 Virus	核酸拷贝数/ μL^{-1} Nucleic acid copy number	Ct ¹⁾		变异系数/% Coefficient of variation	
		批内 Intra-assay	批间 Inter-assay	批内 Intra-assay	批间 Inter-assay
BTV	1×10^7	18.61±0.19	18.89±0.29	1.05	1.54
	1×10^5	25.39±0.26	25.32±0.40	1.03	1.58
	1×10^3	31.37±0.43	32.54±0.46	1.37	1.40
EHDV	1×10^7	19.32±0.25	19.12±0.30	1.30	1.59
	1×10^5	26.28±0.32	26.66±0.48	1.22	1.82
	1×10^3	32.62±0.35	33.17±0.40	1.08	1.19
PALV	1×10^7	16.85±0.20	17.15±0.24	1.16	1.38
	1×10^5	24.58±0.27	24.43±0.40	1.10	1.64
	1×10^3	30.91±0.32	30.55±0.50	1.03	1.44

1)表中数据为平均值±标准差
1)The data are mean ± standard deviation

2.7 毒株与临床血液样本的检测

对 2012—2016 年在我国分离的 BTV、EHDV 和 PALV 不同血清型毒株及分离出病毒的阳性血液样本和 BTV、EHDV 参考毒株核酸同时进行单重和三重 RT-qPCR 检测。结果(表 6 和表 7)显示,本研究建立的三重 RT-qPCR 方法对参考毒株和在我国分离培养的毒株核酸检测 Ct 值为 14.67~27.62,

对血液样本检测 Ct 值为 27.69~35.24; 单重 RT-qPCR 检测病毒毒株 Ct 值为 15.08~26.04, 对血液样品检测 Ct 值为 28.03~34.67。对 2 种方法的检测结果进行单因素方差分析, $P>0.05$, 无显著差异。本研究建立的三重 RT-qPCR 方法可准确检测出国内外 BTV、EHDV 和 PALV 不同血清型毒株及临床血液样本中对应的不同血清型病毒核酸, 具有较好的群

表 6 单重和三重 RT-qPCR 检测中国分离的蓝舌病病毒、流行性出血病病毒和帕利亚姆血清群病毒毒株及对应阳性血液样本的验证试验
Table 6 Demonstration tests of bluetongue virus, epizootic hemorrhagic disease and Palyam serogroup virus strains isolated in China and corresponding blood samples by monoplex and triplex RT-qPCR

血清型 Serotype	毒株 Strain	Ct(病毒样品 Virus sample)		Ct(血液样品 Blood sample)	
		单重 Monoplex	三重 Triplex	单重 Monoplex	三重 Triplex
BTV-1	V147	16.21	16.79	32.01	32.63
BTV-2	V146	22.12	22.60	30.89	30.67
BTV-3	V025	19.03	18.87	30.02	29.82
BTV-4	V030	23.13	23.45	31.52	31.76
BTV-5	V084	20.57	21.67	31.87	32.21
BTV-7	V089	25.23	25.12	31.13	30.53
BTV-9	V008	17.55	17.63	30.21	29.98
BTV-12	V007	21.06	20.15	28.03	27.69
BTV-15	V061	18.73	18.67	32.89	33.13
BTV-16	V109	20.12	19.32	33.34	34.27
BTV-21	V057	24.32	25.07	32.08	31.45
BTV-24	V015	17.55	17.34	34.67	35.24
EHDV-1	V128	18.67	18.69	30.34	29.68
EHDV-5	V127	20.23	20.12	29.76	30.20
EHDV-6	V274	22.95	23.32	34.32	34.46
EHDV-7	V296	15.15	14.67	33.58	32.14
EHDV-10	V280	16.07	16.12	30.31	29.07
CHUV	V144	21.22	20.69	31.68	30.57
DAV	V157	16.32	15.32	30.57	31.75
BCV	V252	23.46	24.54	31.76	32.62

表 7 单重和三重 RT-qPCR 检测蓝舌病病毒和流行性出血病病毒参考毒株的验证试验

Table 7 Demonstration test of reference strains of bluetongue virus and epizootic hemorrhagic disease virus by monoplex and triplex RT-qPCR

血清型 Serotype	Ct		血清型 Serotype	Ct	
	单重 Monoplex	三重 Triplex		单重 Monoplex	三重 Triplex
BTV-1	17.09	16.72	BTV-16	19.66	20.07
BTV-2	20.62	21.45	BTV-17	15.08	14.86
BTV-3	21.09	22.63	BTV-18	18.60	17.32
BTV-4	18.32	17.82	BTV-19	22.23	21.12
BTV-5	20.44	19.31	BTV-20	21.15	20.67
BTV-6	21.16	20.08	BTV-21	26.04	27.62
BTV-7	22.67	23.43	BTV-22	22.62	23.51
BTV-8	15.96	15.67	BTV-23	25.34	26.02
BTV-9	22.26	21.30	BTV-24	20.26	19.09
BTV-10	20.68	21.67	EHDV-1	19.68	18.93
BTV-11	21.75	22.52	EHDV-2	21.79	22.22
BTV-12	21.63	20.03	EHDV-5	18.60	17.45
BTV-13	22.78	23.12	EHDV-6	19.73	18.96
BTV-14	24.06	23.56	EHDV-7	20.62	19.65
BTV-15	23.12	22.67	EHDV-8	19.63	20.05

特异性,与单重检测结果无明显差异。

3 讨论与结论

作为虫媒病毒的 BTV、EHDV 和 PALV 血清型多样,传播途径相同,流行地域重叠,并且在动物感染早期存在部分相似的临床症状。国外研究曾报道 3 种病毒交叉感染的情况^[17]。2013—2016 年在公益性行业(农业)科研专项的资助下,云南省畜牧兽医科学院热带亚热带动物病毒病重点实验室在我国多个虫媒病毒监控点的不同哨兵牛上同时分离出了 BTV、EHDV 和 PALV,对这 3 种病原的早期诊断是一项重大挑战,往往仅能检测出其中 1 种病毒核酸阳性忽略另外 2 种病毒,增加病毒检测的漏检率,不利于动物疫病的防控。基于此,本试验在原有 RT-qPCR 对虫媒病毒的检测基础上,建立了针对 BTV、EHDV 和 PALV 的三重 RT-qPCR 检测方法。

多重 RT-qPCR 方法易受引物、试剂和反应条件等诸多因素影响^[18]。因此本研究首先根据 BTV NS3、EHDV NS1 和 PALV VP7 基因的高度保守性和较好群特异性等特点^[19-21],选择作为引物和探针设计的靶基因,同时适当引入简并碱基,并进行 BLAST 序列对比分析确保引物和探针的保守性和特异性。随后对反应体系的退火温度,模板体积、引物和探针浓度进行了一系列优化,确定了最优反应条件,将复合扩增中引物间、模板间和引物与模板间可能存的竞争抑制和相互干扰降到最低,从而实现从单种病毒检测到同时进行 3 种病毒的检测,节省样品用量、试验资源和操作时间。

本研究利用 BTV、EHDV 和 PALV 的体外转录 ssRNA 对三重 RT-qPCR 灵敏度进行测试并绘制标准曲线,结果显示,三重反应对病毒体外转录 ssRNA 拷贝数最低检测限在 10 μL⁻¹ 级别,与单重反应相比,灵敏度无明显差异。龚雪蕊等^[22]建立的寨卡病毒、登革病毒和基孔肯雅病毒三重 RT-PCR 检测方法的最低拷贝数检出限为 10 μL⁻¹,Nunes 等^[23]报道的用于南美洲汉坦 4 种流行病毒的 RT-qPCR 检测方法的拷贝数灵敏度为 10 μL⁻¹,二者均与本研究相近。本研究构建的标准曲线的相关系数均大于等于 0.998,扩增效率基本相同且均大于 90%,符合 RT-qPCR 扩增效率在 90%~110% 的合理范围。

前期调查发现,BTV、EHDV 和 PALV 在临床上出现混合感染时,3 种病毒在动物血液中的载量会存在较大差异;因此,本试验将 3 种病毒不同浓度的核酸模板进行混合,分析高浓度核酸模板是否对低浓度核酸模板存在干扰。结果显示,一种病毒核酸模板浓度较高而另一种病毒模板浓度较低时,所建立的三重 RT-qPCR 方法依然可以同时检测到 3 种病毒,并且与单重法的结果无明显差异,表明高浓度模板对低浓度模板的扩增检测干扰不明显。重复性试验中,对 3 种病毒高、中、低 3 个浓度的模板 ssRNA 进行检测,变异系数均小于 2%,表明本研究建立的三重 RT-qPCR 检测方法具有较好的稳定性和重复性,有良好的检测效果。

2017 年刘佳佳等^[24]建立了 BTV 和 EHDV 双重 RT-qPCR 检测方法,但仅进行了 1 种 BTV 和 EHDV 血清型的特异性验证。本研究以单重 RT-

qPCR 检测方法作为参照, 使用建立的三重 RT-qPCR 同时对不同 BTV 和 EHDV 血清型参考毒株和我国主要流行的不同 BTV、EHDV 和 PALV 血清型毒株及其阳性血液样品进行检测。结果显示, 本研究建立的三重 RT-qPCR 方法具有较好的群特异性, 可以检测出不同血清型的参考毒株和在我国主要流行的毒株及其血液样品中对应病毒的核酸, 与单重法的检测结果无明显差异。

综上所述, 本研究将在我国已经存在、主要流行于南方热带亚热带地区的 3 种虫媒病毒作为一个组合, 首次建立了一套三重 RT-qPCR 检测方法, 填补了同时检测 BTV、EHDV 和 PALV 3 种病毒核酸方法的空缺。该方法可应用于疫区或出入境动物带毒状况监测, 对早期临床疫病鉴定和防疫指导具有参考价值。此外, 多重 RT-qPCR 检测方法试验步骤简化、样本用量少、试验成本低, 可为疫情防控争取宝贵时间。

参考文献:

- [1] PATEL A, ROY P. The molecular biology of Bluetongue virus replication[J]. *Virus Research*, 2014, 182: 5-20.
- [2] SAVINI G, AFONSO A, MELLOR P, et al. Epizootic haemorrhagic disease[J]. *Research in Veterinary Science*, 2011, 91(1): 1-17.
- [3] WHISTLER T, SWANEPOEL R. Characterization of potentially foetotropic Palyam serogroup orbiviruses isolated in Zimbabwe[J]. *The Journal of General Virology*, 1988, 69(Pt 9): 2221-2227.
- [4] MACLACHLAN N J, DREW C P, DARPEL K E, et al. The pathology and pathogenesis of bluetongue[J]. *Journal of Comparative Pathology*, 2009, 141(1): 1-16.
- [5] SHIRAFUJI H, KATO T, YAMAKAWA M, et al. Characterization of genome segments 2, 3 and 6 of epizootic hemorrhagic disease virus strains isolated in Japan in 1985—2013: Identification of their serotypes and geographical genetic types[J]. *Infection Genetics and Evolution*, 2017, 53: 38-46.
- [6] TATEYAMA S, YAMAGUCHI R, UCHIDA K, et al. An outbreak of congenital hydranencephaly and cerebellar hypoplasia among calves in South Kyushu, Japan: A pathological study[J]. *Research in Veterinary Science*, 1990, 49(2): 127-131.
- [7] MAAN S, MAAN N S, BELAGANAHALLI M N, et al. Development and evaluation of real time RT-PCR assays for detection and typing of bluetongue virus[J]. *PLoS One*, 2016, 11(9): e0163014.
- [8] MAAN N S, MAAN S, POTGIETER A C, et al. Development of real-time RT-PCR assays for detection and typing of epizootic haemorrhagic disease virus[J]. *Transboundary and Emerging Disease*, 2017, 64(4): 1120-1132.
- [9] EBERSOHN K, COETZEE P, SNYMAN L P, et al. Phylogenetic characterization of the Palyam serogroup orbiviruses[J]. *Viruses*, 2019, 11(5): 446-457.
- [10] 李占鸿, 王金萍, 杨恒, 等. 蓝舌病病毒血清 9 型毒株在我国的首次分离[J]. *畜牧兽医学报*, 2019, 50(2): 354-363.
- [11] 杨振兴, 李占鸿, 吴健敏, 等. 2013~2016 年中国流行性出血病病毒血清型 5 型的分离与遗传特征分析[J]. *病毒学报*, 2020, 36(3): 475-483.
- [12] 杨恒, 肖雷, 李占鸿, 等. 2012—2016 年中国南方地区帕利亚姆血清群病毒的分离与序列特征分析[J]. *畜牧兽医学报*, 2018, 49(4): 761-770.
- [13] 朱沛, 肖雷, 朱建波, 等. 2016—2017 年我国蓝舌病病毒 8 型 (BTV-8) 血清学监测与分析[J]. *中国兽医学报*, 2019, 39(8): 1472-1475.
- [14] 杨振兴, 吕敏娜, 朱沛, 等. 我国牛羊流行性出血病血清抗体调查[J]. *中国预防兽医学报*, 2019, 41(1): 29-34.
- [15] 张义爽, 王芳, 武瑞, 等. 我国中山病的血清流行病学调查[J]. *中国预防兽医学报*, 2017, 39(1): 1-4.
- [16] PANG Z, LI A, LI J, et al. Comprehensive multiplex one-step real-time TaqMan RT-qPCR assays for detection and quantification of hemorrhagic fever viruses[J]. *PLoS One*, 2014, 9(4): e95635.
- [17] SCHROEDER M E, JOHNSON D J, OSTLUND E N, et al. Development and performance evaluation of a streamlined method for nucleic acid purification, denaturation, and multiplex detection of *Bluetongue virus* and *Epizootic hemorrhagic disease virus*[J]. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2013, 25(6): 709-719.
- [18] VIAROUGE C, BREARD E, ZIENTARA S, et al. Duplex real-time RT-PCR assays for the detection and typing of epizootic haemorrhagic disease virus[J]. *PLoS One*, 2015, 10(7): e0132540.
- [19] SUN E C, HUANG L P, XU Q Y, et al. Emergence of a novel bluetongue virus serotype, China 2014[J]. *Transboundary and Emerging Disease*, 2016, 63(6): 585-589.
- [20] MACLACHLAN N J, ZIENTARA S, SAVINI G, et al. Epizootic haemorrhagic disease[J]. *Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties*, 2015, 34(2): 341-351.
- [21] YAMAKAWA M, OHASHI S, KANNO T, et al. Genetic diversity of RNA segments 5, 7 and 9 of the Palyam serogroup orbiviruses from Japan, Australia and Zimbabwe[J]. *Virus Research*, 2000, 68(2): 145-153.
- [22] 龚雪蕊, 李阿茜, 刘洋, 等. 寨卡病毒、登革病毒、基孔肯雅病毒三重荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立及评价[J]. *病毒学报*, 2018, 34(1): 52-58.
- [23] NUNES B T D, DE MENDONÇA M H R, SIMITH D D B, et al. Development of RT-qPCR and semi-nested RT-PCR assays for molecular diagnosis of hantavirus pulmonary syndrome[J]. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2019, 13(12): e0007884.
- [24] 刘佳佳, 王慧煜, 艾军, 等. 蓝舌病病毒和鹿流行性出血病病毒双重荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立[J]. *中国兽医科学*, 2017, 47(9): 1124-1128.