

引文格式: 周思佳, 韩佃刚, 董俊, 等. BVDV-1 型实时荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立及应用[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2023, 38(3): 423–430. DOI: [10.12101/j.issn.1004-390X\(n\).202209066](https://doi.org/10.12101/j.issn.1004-390X(n).202209066)

BVDV-1 型实时荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立及应用*

周思佳¹, 韩佃刚², 董俊², 杨云庆², 叶玲玲², 李静², 张冲^{2**}, 信吉阁^{1**}

(1. 云南农业大学 动物医学院, 云南 昆明 650201; 2. 昆明海关技术中心, 云南 昆明 650228)

摘要: 【目的】建立特异针对牛病毒性腹泻病毒基因 1 型 (BVDV-1) 的实时荧光定量 RT-PCR 检测方法。【方法】通过比对分析近 5 年流行的 BVDV-1 毒株全基因序列, 基于保守序列 5'-UTR 设计特异性引物和探针, 优化反应体系和反应条件, 并进行特异性、敏感性、重复性及临床样品检测试验。【结果】BVDV-1 检测的最佳探针浓度为 0.25 $\mu\text{mol/L}$, 引物浓度为 0.60 $\mu\text{mol/L}$, 对阳性质粒标准品的最低检测限为 1.7 copies/ μL 。特异性试验显示: 建立的方法仅能特异性扩增 BVDV-1, 对蓝舌病、口蹄疫、水泡性口炎、小反刍兽疫和猪瘟等病毒不发生交叉反应, 特异性良好, 变异系数小于 1%。采用建立的方法对 172 份临床血液样本进行 BVDV 核酸检测, 结果检出 BVDV 阳性样本 33 份, 阳性率为 19.19%, 与《牛病毒性腹泻/粘膜病诊断技术规范》(GB/T 18637—2018) 中实时荧光定量 RT-PCR 检测结果一致。【结论】本研究建立的 BVDV 基因 1 型实时荧光定量 RT-PCR 检测方法特异性强、敏感性高、重复性好, 可用于临床样本的检测, 为 BVDV-1 的检测及监测提供了有力的技术手段。

关键词: 牛病毒性腹泻病毒基因 1 型 (BVDV-1); 实时荧光定量 RT-PCR; 病毒检测

中图分类号: S852.653 文献标志码: A 文章编号: 1004-390X (2023) 03-0423-08

Establishment and Application of Real-time Fluorescence Quantitative RT-PCR for Detection of BVDV Genotype 1

ZHOU Sijia¹, HAN Diangang², DONG Jun², YANG Yunqing²,
YE Lingling², LI Jing², ZHANG Chong², XIN Jige¹

(1. College of Veterinary Medicine, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;

2. Technology Center of Kunming Customs, Kunming 650228, China)

Abstract: [Purpose] To establish a real-time fluorescence quantitative RT-PCR for detection of bovine viral diarrhoea virus of genotype 1 (BVDV-1). [Methods] The specific primers and probes were designed based on the analysis of the genome sequence of the dominant BVDV-1 strains in past five years. Reaction system and condition of the real-time fluorescence quantitative PCR detection method were screened and optimized. The specificity, sensitivity, reproducibility, and clinical sample testing were conducted. [Results] The optimal probe concentration was 0.25 $\mu\text{mol/L}$ and the primer concentration was 0.60 $\mu\text{mol/L}$. The minimum detection limit for positive template plasmid control

收稿日期: 2022-10-04

修回日期: 2023-06-12

网络首发日期: 2023-07-13

*基金项目: 云南省科技厅重点研发计划 (2018BB004); 国家重点研发计划 (2022YFC2601604)。

作者简介: 周思佳 (1997—), 女, 云南弥勒人, 硕士, 主要从事兽医学研究。E-mail: 1743231550@qq.com

**通信作者 Corresponding authors: 张冲 (1983—), 男, 云南保山人, 博士, 副研究员, 主要从事动物疫病检测研究。E-mail: leofighting@163.com; 信吉阁 (1981—), 女, 吉林桦甸人, 博士, 教授, 主要从事兽医公共卫生研究。E-mail: 1104263681@qq.com

网络首发地址: <https://kns.cnki.net/kcms2/detail/53.1044.S.20230713.0752.001.html>



was 1.7 copies/ μ L. The specificity assay showed the established method only specifically amplified BVDV-1, while no amplification of blue tongue disease virus, foot-and-mouth disease virus, vesicle stomatitis virus, peste des petits ruminants virus and swine fever virus. Good repeatability was obtained with a coefficient of variation less than 1%. Detection of 172 clinical blood samples using the established method, it revealed 33 BVDV-1 positive samples with a positive rate of 19.19%, which was consistent with the result obtained by real-time fluorescence quantitative RT-PCR in the national standard of the diagnostic techniques for bovine viral diarrhea/mucosal disease in China (GB/T 18637—2018). [**Conclusion**] The established method of real-time fluorescence quantitative PCR for detection of BVDV-1 is specific, sensitive and with a good repeatability. It can be used for detection and monitoring of BVDV-1 type, and provides a powerful technical means for detection and monitoring of BVDV-1

Keywords: bovine viral diarrhea virus genotype 1 (BVDV-1); real-time fluorescence quantitative RT-PCR; virus detection

牛病毒性腹泻病是由牛病毒性腹泻病毒 (bovine viral diarrhea virus, BVDV) 引起的一种世界性重要传染病^[1-2]。临床表现包括高烧、严重腹泻、黏膜糜烂和坏死,甚至在发病后数日内死亡;孕牛感染则会出现流产、早产、胎儿畸形和持续性感染等^[3]。BVDV 属于黄病毒科 (Flaviviridae) 瘟病毒属 (*Pestivirus*), 仅有 1 个血清型;依据其 5'非翻译区 (5'-untranslated region, 5'-UTR) 及基因组结构差异已鉴定出 3 个基因型,依次为 BVDV-1、BVDV-2 和 HoBi-like, BVDV-1 又进一步区分出 22 个基因亚型, BVDV-2 有 4 个基因亚型^[1,4-6]。近年来对中国各地区开展的多项 BVDV 流行病学调查研究显示:中国主要流行的 BVDV 亚型是 BVDV-1a、BVDV-1c 和 BVDV-1m^[7-9]。2014 年 GONG 等^[10]对中国青海牦牛 BVDV 基因分型进行研究,分离鉴定其基因型为 BVDV-1b、BVDV-1d 和 BVDV-1q。可见,中国 BVDV 流行毒株主要为 1 型。

BVDV 的实验室检测方法主要有血清学检测和分子生物学检测^[1]。实时荧光定量 PCR 检测方法是针对病原的检测,不受动物机体本身免疫力的影响,是病毒检测最常用的方法之一。中国已经有 BVDV 实时荧光定量 RT-PCR 检测的国家标准和相关研究^[11-12],但病毒基因的不断加速变异导致传统的核酸检测方法会出现错检和漏检,故需要对病原基因进行全面分析并及时更新检测方法。中国牛病毒性腹泻流行毒株主要为 1 型,目前特异性检测 BVDV-1 型的方法较少,且没有特异性针对 BVDV-1 型的实时荧光定量 RT-PCR 检测标准,不足以支持对 BVDV-1 的研究和流行情

况的了解。

本研究通过对近 5 年流行的 BVDV-1 全基因序列进行比对分析,设计针对 BVDV-1 的特异性引物和探针,经反应条件、体系优化和检测效果测试,建立 BVDV-1 实时荧光定量 RT-PCR 检测方法,并对云南省部分地区临床样本进行检测,以期为 BVDV-1 的调查研究提供有效途径。

1 材料与方法

1.1 病毒和临床样品

供试 BVDV 病毒、蓝舌病病毒 (bluetongue virus, BTV)、猪瘟病毒 (classical swine fever virus, CSFV)、水疱性口炎病毒 (vesicular stomatitis virus, VSV) 和小反刍兽疫病毒 (peste des petits ruminants virus, PPRV) 和口蹄疫病毒 (foot-and-mouth disease virus, FMDV) O 型疫苗均由昆明海关技术中心动物检疫实验室保存,通过病毒 DNA/RNA 提取试剂盒提取核酸;172 份牛全血样品来源于云南省怒江、德宏和临沧等地。

1.2 主要试剂

病毒 DNA/RNA 提取试剂盒购自天隆科技 (西安) 有限公司;凝胶回收试剂盒 (Easy Pure Quick Gel Extraction Kit) 购自天根生化科技 (北京) 有限公司;pMD19-T Vector Cloning Kit 载体购自中美泰和生物技术有限公司;Trans5 α Chemically Competent Cell 购自北京全式金生物技术股份有限公司;HiScript II U⁺ One Step qRT-PCR Probe Kit (诺唯赞,货号 Q223-01) 购自诺唯赞生物科技 (南京) 有限公司;50 $\times$ TAE 缓冲液、琼脂

糖、6×Loading buffer 和 Marker I 均购自宝生物工程 (大连) 有限公司。

1.3 引物和探针的设计合成

从 NCBI GenBank 下载 BVDV-1 全基因序列, 使用 MegAlign 软件对其进行比对, 分析基

因序列保守区域; 根据实时荧光定量 RT-PCR 引物与荧光探针设计原则, 采用 Premier 6.0 设计特异性上游引物 2 条、下游引物 1 条和荧光探针 1 条(表 1), 送至生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

表 1 引物和探针信息
Tab. 1 Information of primer and probe

名称 name	编号 number	序列 (5'→3') sequence	靶基因 target genes
上游引物 forward primers	FW1	5'-CAGTGGYGAGTTCRTTGGATG-3'	5'-UTR
	FW2	5'-CARCAGTGGYGAGTTCRTTG-3'	
下游引物 reverse primers	RV1	5'-TGGGCRTGCCCTCGTCCACG-3'	
探针 probe	probe1	FAM-CTKAAGCCCTGAGTACAGGG-MGB	

1.4 引物筛选

使用 HiScript II U⁺ One Step qRT-PCR Probe Kit 对设计的 2 对引物进行筛选, 并选择 1 对最佳引物进行后续试验。反应体系为 20.0 μL, 包括 2×One Step U⁺ Mix 10.0 μL、One Step U⁺ Enzyme Mix 1.0 μL、50×ROX Reference Dye I 0.4 μL、10 μmol/L 上游引物 0.4 μL、10 μmol/L 下游引物 0.4 μL、10 μmol/L TaqMan 探针 0.2 μL、模板 RNA 2.0 μL 和 H₂O 5.6 μL。反应程序为: 55 ℃ 反转录 15 min; 94 ℃ 预变性 10 s; 92 ℃ 变性 15 s, 45 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 1 min, 预扩增 5 个循环; 92 ℃ 变性 10 s, 56 ℃ 退火、延伸 1 min, 采集 FAM 荧光, 扩增 40 个循环。

1.5 反应条件优化

为达到最佳检测效果, 使用方阵法对引物和探针浓度进行筛选。由于探针加入量较小, 为保证试验的精确度, 稀释引物浓度为 10 μmol/L、探针浓度为 1 μmol/L。反应总体体系为 20.0 μL, 取上、下游引物终浓度分别为 0.20、0.40、0.60 和 0.80 μmol/L, 探针浓度分别为 0.10、0.15、0.20 和 0.25 μmol/L, 反应体系和程序同 1.4 节。

1.6 模板质粒的制备

经引物筛选后, 使用选定的引物进行目的片段扩增, 反应总体体系为 25.00 μL, 包括 2×One Step Mix (Dye plus) 12.50 μL、One Step Enzyme Mix 1.25 μL、10 μmol/L 上游引物 1.00 μL、10 μmol/L 下游引物 1.00 μL、模板 RNA 2.00 μL 和 H₂O 7.25 μL。反应程序为: 50 ℃ 反转录 30 min; 94 ℃ 预变性 3 min; 94 ℃ 变性 30 s, 55 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 45 s, 扩增 35 个循环; 72 ℃ 总延伸

5 min。扩增产物通过 0.8% 琼脂糖凝胶进行电泳。电泳结束后若见条带与目的条带大小相符, 便将琼脂糖凝胶中的条带切下放入 1.5 mL 离心管中称量(凝胶质量 100 mg, 可视为 100 μL), 参照凝胶回收试剂盒说明书进行后续产物回收。

按照 pMD19-T Vector Cloning Kit 试剂盒说明书, 将上一步回收的目的片段与 pMD19-T 载体进行连接, 构建重组质粒。将连接产物转化入 Trans5α 感受态细胞中涂板培养。挑取单菌落于 37 ℃、250 r/min 培养 3~4 h, 进行菌液 PCR 鉴定。PCR 反应总体体系 25.0 μL, 包括 ExTaq 12.5 μL、10 μmol/L 上游引物 1.0 μL、10 μmol/L 下游引物 1.0 μL、模板 DNA 2.0 μL 和 H₂O 8.5 μL。反应程序为: 95 ℃ 预变性 7 min; 95 ℃ 变性 30 s, 55 ℃ 退火 45 s, 72 ℃ 延伸 45 s, 扩增 35 个循环; 72 ℃ 总延伸 10 min。鉴定为阳性的质粒送至上海生工有限公司进行测序, 并对阳性质粒进行扩繁及保存; 使用质粒提取试剂盒提取阳性质粒, 测定并计算其浓度, 用于后续试验。

1.7 灵敏度试验

经测定, 1.5 节构建的 BVDV 阳性模板质粒质量浓度为 270 ng/μL, 根据阿弗加德罗常数, 将质粒质量浓度转换为相应的拷贝数, 其转换公式为拷贝数=(质量/分子量)×6.0×10²³。经计算, 其分子量为 955 020, 拷贝数为 1.70×10¹¹。将模板质粒按照 10¹~10¹¹ 进行 10 倍梯度稀释后, 对 11 个不同稀释度的模板质粒进行实时荧光定量 PCR 检测, 反应体系为 1.5 节中优化的最佳反应体系, DNA 模板质粒为 1.0 μL, 测定试验的灵敏度。

1.8 特异性试验

按照病毒 RNA/DNA 提取试剂盒说明书提取 BVDV、CSFV、BTV、FMDV、VSV 和 PPRV 等病毒样本的核酸，并进行实时荧光定量 PCR 检测，以 ddH₂O 作为阴性对照进行特异性试验。

1.9 重复性试验

随机选取 3 个不同稀释梯度 (1.70×10⁴、1.70×10⁷ 和 1.70×10⁸) 的 BVDV 模板质粒，每个梯度样本重复 3 次实时荧光定量 PCR 检测，对结果进行数据统计分析，计算其变异系数并评价方法的重复性。

1.10 临床样本检测

采用本试验建立的 BVDV-1 实时荧光定量

RT-PCR 方法，对 172 份临床样品 (血样) 进行检测。样品采自 2021 年云南怒江、德宏和临沧等地具有腹泻临床症状的犍牛。

为检验本研究建立 BVDV-1 检测方法的准确性，同时采用《牛病毒性腹泻/粘膜病诊断技术规范》(GB/T 18637—2018)^[1]中的实时荧光定量 RT-PCR 检测方法对临床样本进行检测，并对检测结果进行比较分析，引物和探针信息见表 2。反应程序为：42 ℃ 反转录 30 min；94 ℃ 预变性 3 min；92 ℃ 变性 15 s，45 ℃ 退火 30 s，72 ℃ 延伸 1 min，预扩增 5 个循环；92 ℃ 变性 10 s，56 ℃ 退火、延伸 1 min，采集 FAM 荧光，扩增 40 个循环。

表 2 国家标准中实时荧光定量 RT-PCR 检测 BVDV 的引物和探针

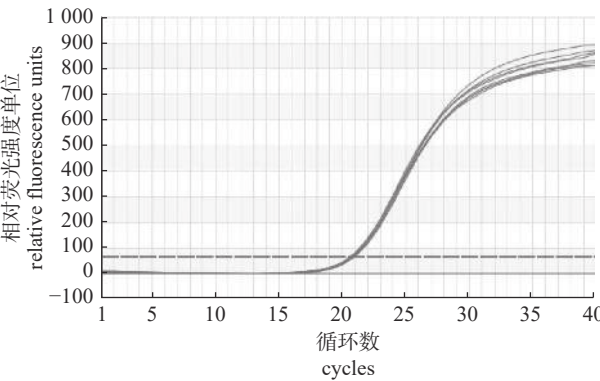
Tab. 2 Primers and probe for real-time fluorescence quantitative RT-PCR detection of BVDV in the national standard

名称 name	序列 (5'→3') sequence	检测靶基因 detection of target genes
上游引物 forward primers	5'-CCGCGAMGCCGAAAAGA-3'	5'-UTR
下游引物 reverse primers	5'-TGACGACTNCCCTGTACTCAG-3'	
探针 probe	FAM-CCATGCCCTTAGTAGGACTAGCA-BHQ1	

2 结果与分析

2.1 引物筛选结果

由图 1 和表 3 可知：引物 FW1+RV1 和 FW2+RV1 的荧光值均较高，但 FW1+RV1 的 Ct 值最小，故选其作为最佳引物进行后续试验。



注：实线为扩增线，虚线为预设定线。
Note: The solid line is the amplification line, and the dotted line is the pre-set setting line.

图 1 引物筛选结果

Fig. 1 Primer screening results

2.2 反应条件优化

由图 2 和表 4 可知：探针浓度为 0.25 μmol/L、引物浓度为 0.60 μmol/L 时荧光值较高，平均 Ct

表 3 引物筛选的 Ct 值

Tab. 3 Ct value of primer screening

样本类型 sample type	Ct 值 Ct value	平均 Ct 值 average Ct value
BVDV (FW1+RV1)	20.762	20.809
	20.699	
	20.801	
	20.973	
	20.832	
BVDV (FW2+RV1)	20.957	20.940
	21.020	
	20.949	
	—	
阴性对照 negative control	—	—

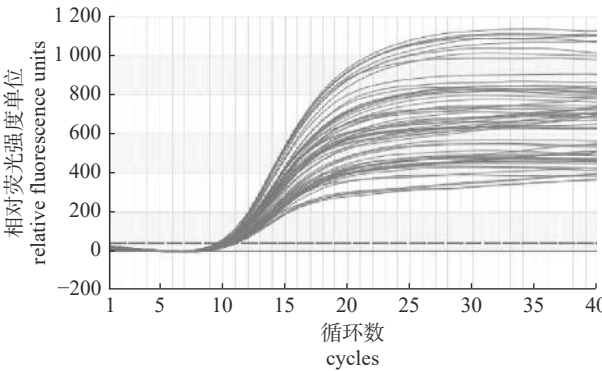


图 2 引物和探针筛选试验

Fig. 2 Primer and probe concentrations screening

表 4 引物和探针筛选的 Ct 值
Tab. 4 Ct value of primer and probe screening

编号 serial number	探针浓度/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) probe concentration	引物浓度/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) primer concentration	Ct值 Ct value	平均Ct值 average Ct value	编号 serial number	探针浓度/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) probe concentration	引物浓度/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) primer concentration	Ct值 Ct value	平均Ct值 average Ct value
1	0.10	0.20	10.566	10.838	10	0.15	0.60	10.238	10.215
			10.840					10.465	
			11.160					10.035	
			10.785					10.121	
2	0.15	0.20	10.434	10.299	11	0.20	0.60	10.285	10.324
			10.254					10.379	
			10.309					10.660	
			10.199					9.973	
3	0.20	0.20	9.934	9.975	12	0.25	0.60	9.645	9.742
			9.988					9.988	
			10.082					9.676	
			9.895					9.660	
4	0.25	0.20	9.879	10.028	13	0.10	0.80	10.832	10.578
			10.043					10.645	
			9.973					10.637	
			10.215					10.199	
5	0.10	0.40	10.848	10.848	14	0.15	0.80	9.926	10.213
			10.535					10.379	
			11.098					10.277	
			10.910					10.270	
6	0.15	0.40	10.262	10.256	15	0.20	0.80	10.996	10.910
			10.168					10.887	
			10.121					11.082	
			10.473					10.676	
7	0.20	0.40	10.012	10.176	16	0.25	0.80	10.098	10.065
			10.418					10.020	
			10.316					10.020	
			9.957					10.121	
8	0.25	0.40	10.230	9.947	17	阴性对照 negative control		—	—
			9.793					—	
			10.184					—	
			9.582					—	
9	0.10	0.60	11.082	10.764					
			10.699						
			10.754						
			10.520						

值最小,故选择该引物和探针浓度进行后续试验。

2.3 模板质粒构建结果

对 2.1 节筛选的引物进行目的片段扩增,经普通 PCR 及凝胶电泳鉴定后,扩增片段与目的片段大小相符,均为 171 bp (图 3)。经测序后与参考序列比对结果显示:实验室保存的毒株基因序列与所下载参考序列同源性高,测序验证正确,获得阳性重组质粒。

2.4 灵敏度试验结果及标准曲线

经检测,BVDV 阳性质粒拷贝数为 1.70 cop-

ies/ μL 时仍可检出 BVDV 阳性 (图 4 和表 5)。所得标准曲线回归方程为: $y=-3.2599x+40.3920$, 相关系数 $R^2=0.9984$, 线性关系良好。

2.5 特异性试验结果

由图 5 和表 6 可知:仅 BVDV 可以被检测,其余病毒核酸均无扩增曲线且无 Ct 值,表明所建立的 BVDV-1 实时荧光定量 RT-PCR 检测方法特异性良好。

2.6 重复性试验结果

选取 3 个不同稀释梯度 (10^4 、 10^7 和 10^8) 的

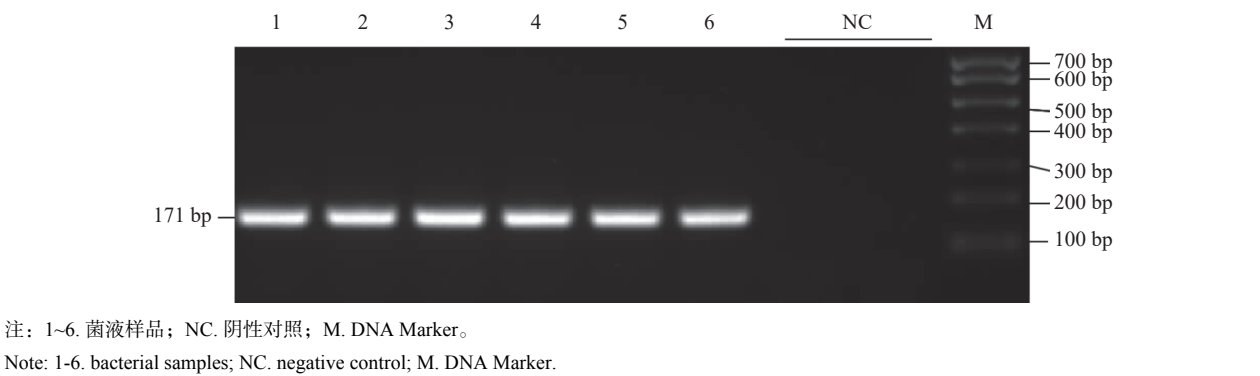
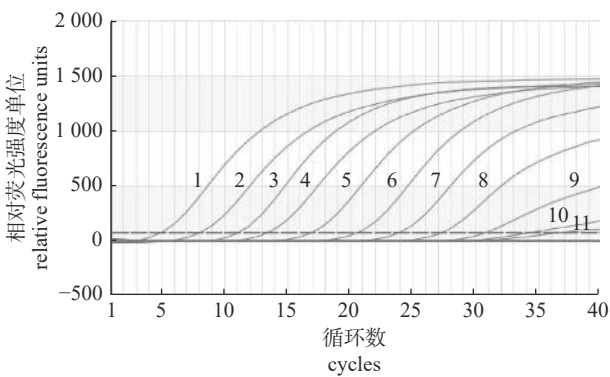


图 3 菌液 PCR 凝胶电泳图

Fig. 3 Gel electrophoresis of bacterial PCR



注：1~11. 样品稀释梯度 $10^1 \sim 10^{-11}$ 。
Note: 1-11. dilution gradients of samples from 10^1 to 10^{-11} .

图 4 实时荧光定量 RT-PCR 灵敏度检测扩增曲线

Fig. 4 Amplification curve of real-time fluorescence quantitative RT-PCR in sensitivity assay

表 5 实时荧光定量 RT-PCR 灵敏度试验对应 Ct 值

Tab. 5 Ct value in the sensitivity assay of real-time fluorescence quantitative RT-PCR

稀释梯度 dilution gradients	拷贝数 number of copies	Ct 值 Ct value
1	17 000 000 000.0	5.004
2	1 700 000 000.0	8.074
3	170 000 000.0	11.207
4	17 000 000.0	13.512
5	1 700 000.0	17.043
6	170 000.0	20.691
7	17 000.0	24.027
8	1 700.0	27.402
9	170.0	30.863
10	17.0	34.504
11	1.7	36.832

BVDV 模板质粒进行重复性试验。由图 6 和表 7 可知：同一稀释梯度的荧光曲线重复性较好，变异系数均小于 1%，表明所建立的实时荧光定量 RT-

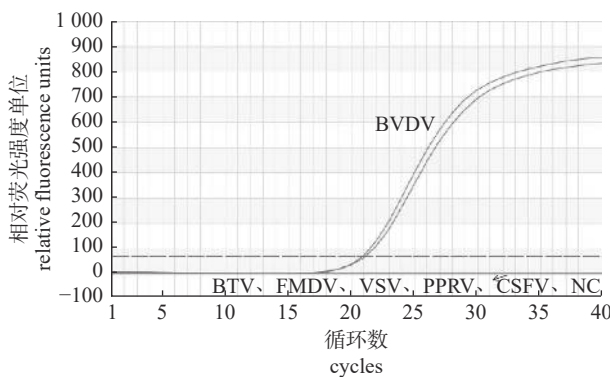


图 5 实时荧光定量 RT-PCR 特异性试验结果

Fig. 5 Specificity assay results of real-time fluorescence quantitative RT-PCR

表 6 实时荧光定量 RT-PCR 特异性试验对应 Ct 值

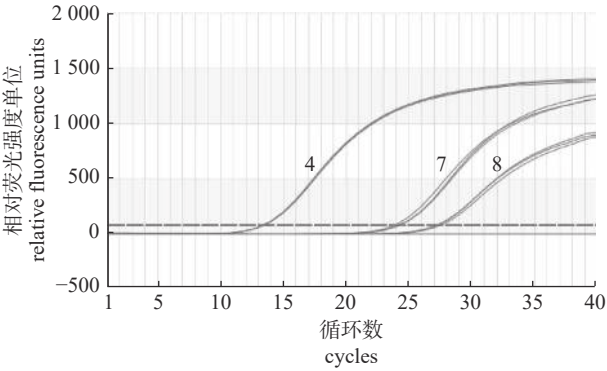
Tab. 6 Ct value of the specificity assay of real-time fluorescence quantitative RT-PCR

样本名称 sample name	Ct 值 Ct value
BTV	—
BTV	—
FMDV	—
FMDV	—
VSV	—
VSV	—
PPRV	—
PPRV	—
CSFV	—
CSFV	—
BVDV	17.648
BVDV	17.650
阴性对照 negative control	—
阴性对照 negative control	—

PCR 具有较好的重复性。

2.7 临床样本检测结果

由表 8 可知：172 份临床样品 (血样) 中，有 33 份检测为阳性，阳性率为 19.19%。33 份样本



注: 4、7 和 8 分别表示稀释梯度 10^4 、 10^7 和 10^8 。
Note: 4, 7 and 8 indicate dilution gradients of 10^4 , 10^7 and 10^8 , respectively.

图 6 3 个稀释梯度的重复性试验结果
Fig. 6 Repetitive assay results for three dilution gradients

表 7 3 个稀释梯度的重复性试验 Ct 值					
Tab. 7 Ct value for three dilution gradients in repeatability assay					
稀释梯度 dilution gradients	拷贝数 number of copies	Ct 值 Ct value	平均 Ct 值 average Ct value	SD 值 SD value	CV 值/% CV value
4	17000000	13.512	13.551	0.032	0.236
		13.559			
		13.582			
7	17000	24.387	24.272	0.173	0.713
		24.402			
		24.027			
8	1700	27.348	27.467	0.134	0.488
		27.652			
		27.402			
阴性对照 negative control	—	—	—	—	—

表 8 实时荧光定量 RT-PCR 临床样本检测结果			
Tab. 8 Clinical sample detected by real-time fluorescence quantitative RT-PCR			
样本来源 sample source	样本数 sample number	阳性数 number of positives	阳性率/% positive rate
怒江 Nujiang	22	5	22.73
德宏 Dehong	45	13	28.89
临沧 Lincang	35	9	25.71
大理 Dali	35	4	11.43
昭通 Zhaotong	35	2	5.71
总计 total	172	33	19.19

经实时荧光定量 RT-PCR 检测国家标准验证均为阳性, 与本试验所建立的实时荧光定量 RT-PCR 检测结果完全一致。

3 讨论

BVDV 已在世界各地广泛流行和蔓延, 对中国牛养殖业也造成了重大的经济损失^[1]。现阶段, 疫苗接种并未取得理想效果, 因此, 高效准确的检测方法对于发病牛的诊断和牛场生物安全防控尤为重要。本研究比对分析了近年流行的 BVDV 全基因序列, 发现 BVDV 的 3 种基因型差异较大, 无法兼顾高灵敏度及全面检出, 因此本研究针对国内主要流行的 BVDV 基因 1 型毒株 5'-UTR 保守区域设计引物和探针, 经过筛选和优化建立 BVDV-1 实时荧光定量 RT-PCR 检测方法。试验结果表明: 该方法具有较好的特异性, 最低检测下限为 1.7 copies/ μ L, 具有较高的敏感度, 变异系数均小于 1%, 重复性良好。与赵成莹等^[12]开展的 BVDV RT-PCR 方法相比较, 本研究所建立的方法灵敏度更高。张宇名等^[13]建立了 BVDV 可视化一步 RT-LAMP 检测法, 可在 30 min 内完成检测, 对 BVDV RNA 检测下限最低达 0.021 pg/ μ L。魏宇等^[14]建立了 BVDV 和牛冠状病毒双重纳米 RT-PCR 检测方法, 为常规 RT-PCR 敏感性的 10 倍, 最低检出限为 1 fg。王以欣等^[15]制备了 BVDV 单克隆抗体并应用于病毒检测。BVDV 检测方法不断改进完善, 一些新兴技术被应用于 BVDV 的检测, 如双重纳米 RT-PCR 法、RPA-LFD 技术、抗体液相芯片技术、纳米抗体 ELISA 和 CRISPR 等^[16-20]。近年来开展的 BVDV 检测方法研究为疫病诊断和流行病学调查提供了必要的技术支持。

中国云南边境地区与老挝、缅甸和越南等国频繁有频繁的出入境动物经济贸易, 且周边国家兽医防疫体系落后, 导致进入中国的动物病毒带毒风险较高, 边境地区病毒防控压力巨大。采用本研究所建立的实时荧光定量 RT-PCR 方法对云南省 5 个地区的 172 份牛血样进行临床样品检测, 检测结果为 33 份样品为 BVDV 阳性, 阳性率为 19.19%, 与国家标准检测结果一致, 说明本研究所建立的检测方法具有较高的准确性, 对云南 BVDV-1 的流行病学研究和防治具有重要意义。在荧光 PCR 反应程序中, 预变性可使引物完全变性解开, 从而保证引物为单链 DNA, 提高了扩增效率。1 个高效的目标序列预扩增步骤可以显著提高整体检测灵敏度, 在本研究建立的实时荧光定量 PCR 反应程序中增加了 5 个循环的预扩增程序, 灵敏度显

著提高,最低可检测 1.7 copies/ μ L 的样本。此外,本研究建立的标准曲线为 $y=-3.2599x+40.3920$, 相关系数 $R^2=0.9984$, 其中 y 值为 Ct 值, x 值为拷贝数的 log 值。对横坐标参数进行赋值,令 x 值为 0,即样本中 BVDV 的模板含量拷贝数为 1,得到的最大 Ct 值为 40.3920,约等于 40。因此,Ct 值 40 可作为本方法判定结果的临界值,即 Ct 值大于 40 即判定为阴性,Ct 值小于 40 则判定为阳性,该方法的结果判定更加方便简单。

4 结论

本研究建立了 BVDV 基因 1 型实时荧光定量 RT-PCR 检测方法,该方法灵敏度高,特异性强,具备良好的重复性,对牛全血样品 BVDV 检出效果较好,能够为 BVDV-1 的快速诊断和病毒研究提供有价值的参考。

[参考文献]

- [1] AL-KUBATI A A G, HUSSEN J, KANDEEL M, et al. Recent advances on the bovine viral diarrhea virus molecular pathogenesis, immune response, and vaccines development[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2021, 8: 665128. DOI: [10.3389/fvets.2021.665128](https://doi.org/10.3389/fvets.2021.665128).
- [2] SCHARNBÖCK B, FRANZ-FERDINAND R, RICHTER V, et al. A meta-analysis of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) prevalences in the global cattle population[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 14420. DOI: [10.1038/s41598-018-32831-2](https://doi.org/10.1038/s41598-018-32831-2).
- [3] LANYON S R, HILL F I, REICHEL M P, et al. Bovine viral diarrhoea: pathogenesis and diagnosis[J]. *The Veterinary Journal*, 2014, 199(2): 201. DOI: [10.1016/j.tvjl.2013.07.024](https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.07.024).
- [4] LANAVE G, DECARO N, LUCENTE M S, et al. Circulation of multiple subtypes of bovine viral diarrhoea virus type 1 with no evidence for HoBi-like pestivirus in cattle herds of southern Italy[J]. *Infection Genetics and Evolution*, 2017, 50: 1. DOI: [10.1016/j.meegid.2017.02.009](https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.02.009).
- [5] RIDPATH J F, BOLIN S R, DUBOVI E J. Segregation of bovine viral diarrhea virus into genotypes[J]. *Virology*, 1994, 205(1): 66. DOI: [10.1006/viro.1994.1620](https://doi.org/10.1006/viro.1994.1620).
- [6] GETHMANN J, HOMEIER T, HOLSTEG M, et al. BVD-2 outbreak leads to high losses in cattle farms in Western Germany[J]. *Heliyon*, 2015, 1(1): e00019. DOI: [10.1016/j.heliyon.2015.e00019](https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2015.e00019).
- [7] CHANG L L, QI Y P, LIU D, et al. Molecular detection and genotyping of bovine viral diarrhea virus in Western China[J]. *BMC Veterinary Research*, 2021, 17(1): 66. DOI: [10.1186/s12917-021-02747-7](https://doi.org/10.1186/s12917-021-02747-7).
- [8] DENG M L, CHEN N, GUIDARINI C, et al. Prevalence and genetic diversity of bovine viral diarrhea virus in dairy herds of China[J]. *Veterinary Microbiology*, 2020, 242: 108565. DOI: [10.1016/j.vetmic.2019.108565](https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.108565).
- [9] HOU P L, ZHAO G M, WANG H M, et al. Prevalence of bovine viral diarrhea virus in dairy cattle herds in eastern China[J]. *Tropical Animal Health and Production*, 2019, 51(4): 791. DOI: [10.1007/s11250-018-1751-z](https://doi.org/10.1007/s11250-018-1751-z).
- [10] GONG X W, LIU L H, ZHENG F Y, et al. Molecular investigation of bovine viral diarrhea virus infection in yaks (*Bos gruniens*) from Qinghai, China[J]. *The Veterinary Journal*, 2014, 11(1): 29. DOI: [10.1186/1743-422X-11-29](https://doi.org/10.1186/1743-422X-11-29).
- [11] GB/T 18637—2018. 牛病毒性腹泻/粘膜病诊断技术规范[S].
- [12] 赵成莹, 张娅娣, 袁静, 等. 牛病毒性腹泻病毒通用型及分型 RT-PCR 检测方法的建立及应用[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2023(7): 66. DOI: [10.13881/j.cnki.hljxmsy.2022.04.0166](https://doi.org/10.13881/j.cnki.hljxmsy.2022.04.0166).
- [13] 张宇名, 李树凡, 陈志远, 等. 牛病毒性腹泻病毒可视化一步 RT-LAMP 检测方法的建立[J]. *中国兽医科学*, 2022, 52(8): 985. DOI: [10.16656/j.issn.1673-4696.2022.0120](https://doi.org/10.16656/j.issn.1673-4696.2022.0120).
- [14] 魏宇, 王海璐, 孙飞雁, 等. 牛病毒性腹泻病毒和牛冠状病毒双重纳米 RT-PCR 检测方法的建立及应用[J]. *畜牧与兽医*, 2022, 54(3): 101.
- [15] 王以欣, 姜晓霞, 孙晓波, 等. 牛病毒性腹泻病毒单克隆抗体的制备及其在该病毒检测中的应用[J]. *中国预防兽医学报*, 2022, 44(6): 624. DOI: [10.3969/j.issn.1008-0589.202111010](https://doi.org/10.3969/j.issn.1008-0589.202111010).
- [16] EMADI A, KHIABAN L A, LOTFI M, et al. Development of an in-house indirect ELISA for detection of bovine viral diarrhoea virus antibodies in bovine sera[J]. *Journal of Virological Methods*, 2022, 308: 114576. DOI: [10.1016/j.jviromet.2022.114576](https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2022.114576).
- [17] 杨森, 王倩颖, 刘可欣, 等. 牛病毒性腹泻病毒重组酶聚合酶扩增结合侧流层析试纸条(RPA-LFD)快速诊断方法的建立与应用[J]. *中国兽医科学*, 2022, 52(6): 685. DOI: [10.16656/j.issn.1673-4696.2022.0119](https://doi.org/10.16656/j.issn.1673-4696.2022.0119).
- [18] 王群, 郑小龙, 姜帆, 等. 牛病毒性腹泻病毒抗体液相芯片高效检测方法的建立[J]. *中国兽医科学*, 2022, 52(10): 1268. DOI: [10.16656/j.issn.1673-4696.2022.0194](https://doi.org/10.16656/j.issn.1673-4696.2022.0194).
- [19] 周子恒. 牛病毒性腹泻病毒纳米抗体 ELISA 检测方法的初步研究[D]. 石河子: 石河子大学, 2019.
- [20] YAO R, XU Y R, WANG L, et al. CRISPR-Cas13a-based detection for bovine viral diarrhea virus[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2021, 8: 603919. DOI: [10.3389/fvets.2021.603919](https://doi.org/10.3389/fvets.2021.603919).

责任编辑: 何馨成