

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2024.05.03

小反刍兽疫病毒液滴式数字 PCR 检测方法的建立及应用

苏佳,赵炜,刘伟洁,白洪旭,陈延飞,孙淼,吴华伟,薛青红*,陈晓春*

(中国兽医药品监察所(农业农村部兽药评审中心),北京 100081)

[收稿日期] 2023-11-03 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2024) 05-0017-09 [中图分类号] S852.65

[摘要] 为实现小反刍兽疫病毒(Peste des petits ruminants virus, PPRV)的快速、准确、定量检测,以国内 PPRV Clone 9 疫苗株 N 基因为靶位点设计特异性引物及探针,建立了液滴式数字 PCR (Droplet digital PCR, ddPCR) 方法,并对其特异性、敏感性及重复性进行评价。将所建立的 ddPCR 方法与实时荧光定量 PCR (Fluorescence quantitative PCR, qPCR) 方法的灵敏度进行比较分析并应用于 PPRV (Clone 9 株) 核糖核酸标准物质的定量。结果显示,所建立的 ddPCR 方法特异性好,仅 PPRV 检测结果为阳性,其他羊源病毒类生物制品及毒种检测结果均为阴性;敏感性高,基因拷贝数检出限度为 4.33 拷贝/ μL ,比 qPCR 方法的灵敏度(57.3 拷贝/ μL)高 10 倍;重复性好,重复性试验的变异系数为 1.8%;定量准确,具有一定资质的 9 家单位各组测量数据组间变异系数小于 5%。试验建立的 ddPCR 方法能够有效地对 PPRV 核酸进行快速检测,为 PPRV 的诊断及绝对定量提供了有效方法。

[关键词] 小反刍兽疫病毒;液滴式数字 PCR;荧光定量 PCR;检测

Establishment and Application of a Droplet Digital PCR Assay for Detection of Peste des Petits Ruminants Virus

SU Jia, ZHAO Wei, LIU Wei-jie, BAI Hong-xu, CHEN Yan-fei, SUN Miao,

WU Hua-wei, XUE Qing-hong*, CHEN Xiao-chun*

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Corresponding authors: XUE Qing-hong, E-mail: 732574709@qq.com; CHEN Xiao-chun, E-mail: chunxiao1981@126.com

Abstract: In order to achieve rapid, accurate and quantitative detection of Peste des petits ruminants virus (PPRV), a droplet digital PCR (ddPCR) method was established with specific primers and probe targeting the N gene of the domestic vaccine strain PPRV Clone 9, and the specificity, sensitivity and repeatability of the method

基金项目: 国家重点研发计划动物疫病口岸检疫与风险防范技术研发及应用(2021YFD1800500)

作者简介: 苏佳,博士,助理研究员,从事兽用生物制品检验及研究工作。

通讯作者: 薛青红, E-mail: 732574709@qq.com; 陈晓春, E-mail: chunxiao1981@126.com

were evaluated. At the same time, the sensitivity of the established ddPCR method was compared with that of the real-time fluorescence quantitative PCR (qPCR) method. Finally, the established ddPCR method was applied to the quantification of PPRV (Clone 9 strain) ribonucleic acid reference material. The results showed that the ddPCR method had good specificity, with only positive results for PPRV detection and negative results for other sheep-derived virus biological products and viruses. The sensitivity of the ddPCR method was high, with a detection limit of 4.33 copies/ μL , which was 10 times higher than the sensitivity of the qPCR method (57.3 copies/ μL). The coefficient of variation of the repeatability test was 1.8% in the ddPCR method. Besides, the ddPCR method was accurate in quantification, as the coefficient of variation was less than 5% between groups of measurement data in the nine qualified institutions. The ddPCR method established in this study can effectively and rapidly detect PPRV nucleic acid, providing an effective method for the diagnosis and absolute quantification of PPRV.

Key words: Peste des petits ruminants virus; droplet digital PCR; fluorescence quantitative PCR; detection

小反刍兽疫是由小反刍兽疫病毒 (Peste des petits ruminants virus, PPRV) 感染野生和家养小反刍兽引起的急性、高度接触性、烈性传染病, 主要临床特征是急性发热、间质性或化脓性肠炎、恶性腹泻、呼吸道和消化道黏膜症状以及怀孕母羊流产等, 通常认为山羊比绵羊易感^[1], 发病率可达 100%, 病死率高达 90% ~ 100%^[2], 细菌和寄生虫并发感染会加重病情。此外, 也有羚羊、野生山羊、牛、水牛、骆驼以及食肉动物被感染的报道, 如亚洲狮、犬都会发生感染并产生相应亚临床症状^[3-5]。在实验室条件下, PPRV 还可以感染猪和老鼠^[6-7]。基于该病对小反刍兽养殖业健康发展造成的严重危害^[8], WOAHP 将其列为法定报告疫病之一, 而我国将其列为一类动物疫病。

2015 年 OIE/FAO 共同启动《全球小反刍兽疫控制与根除计划》, 提出了“2030 年在全世界范围内消灭小反刍兽疫”的奋斗目标。然而截至 2022 年, 全球范围内仅有 59 个国家和 1 个地区为官方无疫区^[9]。灵敏快速和精准的诊断技术将为小反刍兽疫的防治发挥重要支持作用, 助力该病根除计划的实现。对于小反刍兽疫的分子生物学诊断方法目前以普通 PCR 及 qPCR 为主。普通 PCR 方法具有敏感性较高、特异性强等优点, 但无法实现样品的定量检测, 且需要后续核酸电泳等步骤, 易出现交叉污染^[10]; qPCR 具有快速、敏感性更高、特异性强及无需核酸电泳等优点, 但其对样品的定量检

测依赖标准品质粒。数字 PCR (Digital PCR, dPCR) 是继 qPCR 之后新兴发展起来的一种绝对定量分析技术, 其原理是将一份样品均分成数万个反应, 反应结束后统计各反应有无阳性荧光信号, 根据泊松分布原理, 通过分析软件可直接实现靶标分子的绝对定量^[11]。基于其更高灵敏度和准确度, dPCR 技术已广泛应用到病原检测^[12-13]、标准物质定值^[14-15]等领域。为此, 本研究以 PPRV *N* 基因保守区域为靶标, 建立了特异性强、重复性好、灵敏度高、可实现绝对定量的液滴式数字 PCR (Droplet digital PCR, ddPCR) 方法, 为小反刍兽疫的防治提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 核酸标准物质 PPRV (Clone 9 株) 核糖核酸标准物质 (编号: GBW (E) 091271)。

1.1.2 病毒 狂犬病病毒 AV61 株、伪狂犬病病毒 Bartha-K61 株、山羊痘病毒 AV41 株和绵羊痘病毒 AV43 株由中国兽医药品监察所保存; 口蹄疫 O 型、A 型二价灭活疫苗 (OHM/02 株 + AKT-III 株) 购自天康生物制药有限公司。

1.1.3 主要试剂与仪器 病毒基因组 DNA/RNA 提取试剂盒购自 Qiagen 公司; ddPCR (Probes) Kit 和 One-Step RT-ddPCR (Probes) Kit 购自苏州思纳福医疗科技有限公司; 2 × Fast qPCR Mix (Probes) Kit 购自北京博迈德基因技术有限公司。

主要仪器设备包括 Qiagen 自动核酸提取仪、Roche Light Cycler 480 II 荧光定量 PCR 仪和思纳福 SQD-X4 数字 PCR 仪等。

1.2 方法

1.2.1 特异性引物及探针的设计合成 根据 GenBank 上公布的 PPRV 全基因组序列,经 BLAST 比对分析,针对 PPRV Clone 9 疫苗株 *N* 基因保守区域设计特异性引物及探针(表 1)。引物和探针由北京六合华大基因科技有限公司合成。

表 1 引物和探针序列

Tab 1 Primers and probe

引物和探针	序列 5'-3'
PPRV - N - F	TTCCGTCTCGGACAGGAGAT
PPRV - N - R	CCCAGTCTGTGAGGCGATT
PPRV - N - P	FAM - CGCGGCTGAGCTTGGTATCACA - TAMRA

1.2.2 ddPCR 方法反应体系的优化 取 PPRV (Clone 9 株)核糖核酸标准物质 100 μ L 提取病毒核酸后作为模板,建立 20 μ L ddPCR 反应体系,即固定 One - step RT - ddPCR mix 10 μ L, Reverse transcriptase 2 μ L,模板 2 μ L,选择三个引物和探针组合(600 - 150 nmol/L、750 - 250 nmol/L、900 - 350 nmol/L)用 ddH₂O 补齐至 20 μ L,进行 ddPCR 实验,综合考虑拷贝数检测结果及阴阳性液滴分布情况,筛选出最优的探针浓度以及引物浓度。其中,反应程序为 50 $^{\circ}$ C 20 min;95 $^{\circ}$ C 3 min;94 $^{\circ}$ C 15 s,55 $^{\circ}$ C 45 s,40 个循环,升降温速率 2.0 $^{\circ}$ C/s。

1.2.3 ddPCR 方法退火温度的优化 按照上述 20 μ L ddPCR 反应体系,分别设置 55 $^{\circ}$ C、58 $^{\circ}$ C、60 $^{\circ}$ C 和 65 $^{\circ}$ C 四个退火温度进行 ddPCR 实验,综合考虑拷贝数检测结果及阴阳性液滴分布情况,确定反应的最优退火温度。

1.2.4 ddPCR 方法升降温速率的优化 升降温速率是 ddPCR 实验中很关键的影响因素,过快会影响微滴的稳定性,也会影响 ddPCR 扩增效率,过慢会导致阳性微滴散乱,影响实验效果。按照上述 20 μ L ddPCR 反应体系,反应程序选择优化好的退火温度,其他反应程序不变,只改变升降温速率,设

置 1.0 $^{\circ}$ C/s、2.0 $^{\circ}$ C/s 和 3.0 $^{\circ}$ C/s 三种升降温速率进行 ddPCR 实验,确定反应的最佳升降温速率。

1.2.5 特异性试验 分别取 PPRV (Clone 9 株)核糖核酸标准物质、其他家羊病毒类生物制品或种毒(口蹄疫灭活疫苗、狂犬病病毒、山羊痘病毒、绵羊痘病毒和伪狂犬病病毒)100 μ L 使用病毒基因组 DNA/RNA 提取试剂盒提取病毒核酸,同时用双蒸水作为阴性对照,针对山羊痘病毒、绵羊痘病毒和伪狂犬病病毒使用 ddPCR (Probes) Kit,针对口蹄疫病毒和狂犬病病毒使用 One - Step RT - ddPCR (Probes) Kit,分别进行 ddPCR 检测,评价所建立 ddPCR 方法的特异性。

1.2.6 重复性试验 取两份 PPRV (Clone 9 株)核糖核酸标准物质,分别提取核酸后,使用 ddPCR 检测,各检测 3 次,计算变异系数,分析所建立的 ddPCR 方法的可重复性。

1.2.7 敏感性试验 将提取的 PPRV 核酸进行 10 倍倍比稀释,取 10^0 、 10^{-1} 、 10^{-2} 和 10^{-3} 稀释度进行 ddPCR 检测,每个浓度做 3 个重复检测。根据 ddPCR 检测结果通过梯度稀释建立线性图谱,确定其检测基因拷贝数的灵敏度。

1.2.8 qPCR 方法的敏感性试验 合成 PPRV Clone 9 株 *N* 基因,连接至 pMV 载体,构建 pMV - Clone 9 - N 质粒作为 qPCR 阳性标准品质粒,使用超微量核酸蛋白检测仪测定质粒浓度,根据公式计算重组质粒拷贝数(N)。N = (质粒浓度 (ng/ μ L) $\times 10^{-9} \times 6.02 \times 10^{23}$) / (重组质粒碱基数 $\times 660$)。分别将标准品质粒 10 倍系列稀释后作为模板,进行 qPCR 检测,确定 qPCR 方法的灵敏度。其中,配置 20 μ L 反应体系:2 \times Fast qPCR Mix 10 μ L,上、下游引物(10 μ mol/L)各 0.8 μ L,探针(10 μ mol/L) 0.2 μ L,模板 2 μ L,ddH₂O 6.2 μ L;反应程序:95 $^{\circ}$ C 5 min;95 $^{\circ}$ C 10 s,60 $^{\circ}$ C 50 s,40 个循环,收集荧光信号。

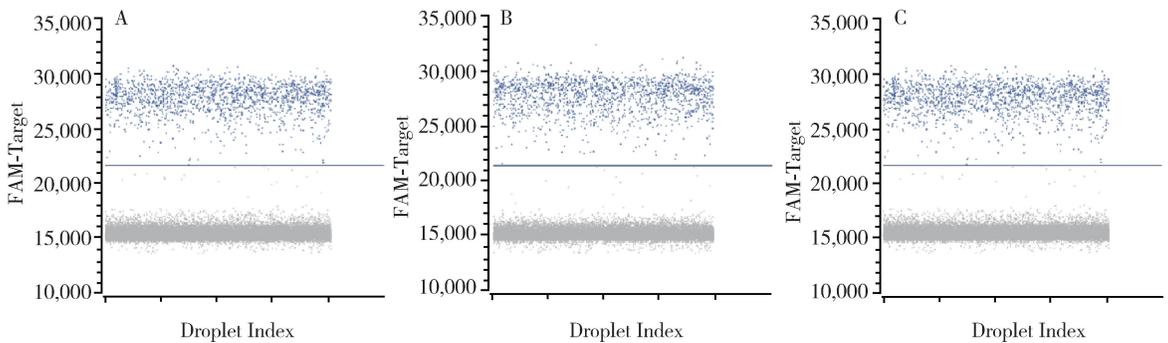
1.2.9 PPRV (Clone 9 株)核糖核酸标准物质的定量 选择 9 家单位(中国兽医药品监察所、青岛海关技术中心、浙江省检验检疫科学技术研究院、致准(嘉兴)生物科技有限公司、山东省动物疫病预防控制中心、上海市动物疫病预防控制中心、北京

疾病预防控制中心、农业农村部特种经济动植物及产品质量监督检验测试中心和北京市动物疫病预防控制中心,下文缩写为 A-I) 分别独立使用本研究建立的 ddPCR 方法对 PPRV (Clone 9 株) 核糖核酸标准物质进行定量,每家单位各检测 2 管标准物质,每管重复检测 3 次,分析各定量数据间是否存在显著性差异。

2 结果与分析

2.1 ddPCR 方法反应体系的优化 结果见图 1。三种引物和探针组合中,阴阳性液滴分布无明显差

异,测得 N 基因拷贝数分别为 7.0×10^2 拷贝/ μL 、 1.06×10^3 拷贝/ μL 和 1.05×10^3 拷贝/ μL ,其中,750 nmol/L 的引物和 250 nmol/L 的探针反应浓度,即上、下引物(10 $\mu\text{mol/L}$)添加量各为 0.75 μL ,探针(10 $\mu\text{mol/L}$)添加量为 0.5 μL 时,测得 N 基因拷贝数最高,为 1.06×10^3 拷贝/ μL ,故选择此浓度作为最终引物和探针反应浓度。确定 20 μL 反应体系为: One-step RT-ddPCR mix 10 μL , Reverse transcriptase 2 μL , 上下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 0.75 μL , 探针(10 $\mu\text{mol/L}$)0.5 μL , 模板 2 μL , ddH₂O 4 μL 。



A: 引物和探针反应浓度为 600 nmol/L 和 150 nmol/L; B: 引物和探针反应浓度为 750 nmol/L 和 250 nmol/L;

C: 引物和探针反应浓度为 900 nmol/L 和 350 nmol/L。

图 1 ddPCR 方法引物和探针浓度的优化

Fig 1 Optimization of primers and probe concentration for the ddPCR assay

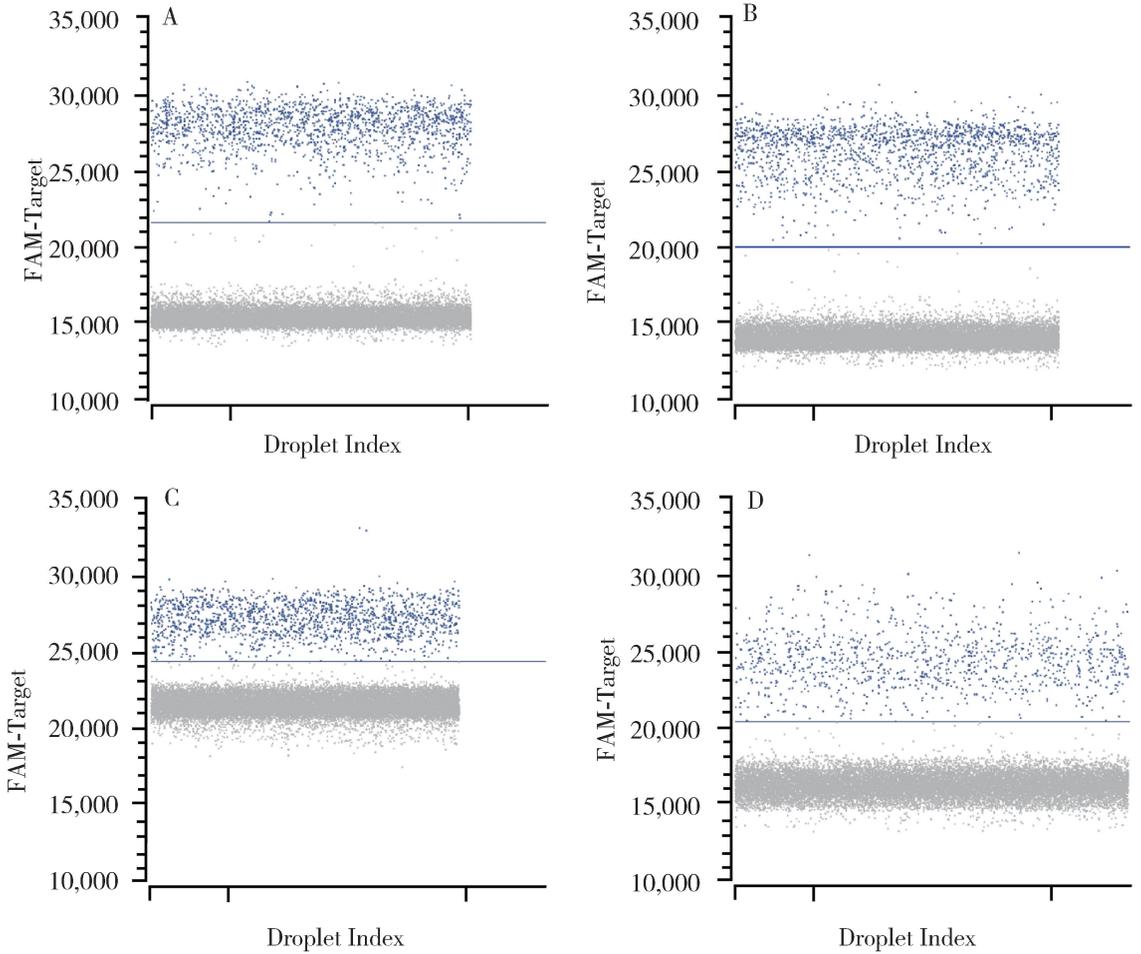
2.2 ddPCR 方法退火温度的优化 结果见图 2。在 55 $^{\circ}\text{C}$ 和 58 $^{\circ}\text{C}$ 退火温度时,阴阳性液滴分散效果无显著区别,拷贝数分别为 1.04×10^3 拷贝/ μL 和 1.08×10^3 拷贝/ μL ;60 $^{\circ}\text{C}$ 退火温度时,阴阳性液滴的荧光信号值的差值比 55 $^{\circ}\text{C}$ 和 58 $^{\circ}\text{C}$ 退火温度时的差值要小,且拷贝数较低,为 9×10^2 拷贝/ μL ;65 $^{\circ}\text{C}$ 退火温度时,阴性液滴集中,但阳性液滴分散,拷贝数较低,为 8.5×10^2 拷贝/ μL 。为保证探针的特异性,将退火温度定为 58 $^{\circ}\text{C}$ 。建立反应程序: 50 $^{\circ}\text{C}$ 20 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,58 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 40 个循环,升降温速率 2.0 $^{\circ}\text{C/s}$ 。

2.3 ddPCR 方法升降温速率的优化 结果见图 3。1.0 $^{\circ}\text{C/s}$ 、2.0 $^{\circ}\text{C/s}$ 和 3.0 $^{\circ}\text{C/s}$ 三种升降温速率的扩增结果分别为 1.82×10^3 拷贝/ μL 、 1.92×10^3 拷贝/ μL 和 1.83×10^3 拷贝/ μL ,2.0 $^{\circ}\text{C/s}$ 升降温速率

下,阴阳性液滴荧光信号值的差值相较另外两种升降温速率时的差值要大,且检测到的拷贝数最高,所以选择 2.0 $^{\circ}\text{C/s}$ 的升降温速率。

2.4 特异性试验 图 4 结果显示,所建立的 ddPCR 方法对 PPRV Clone 9 株可以检测到特异性阳性液滴信号,而对其他家羊病毒类生物制品或种毒(口蹄疫灭活疫苗、狂犬病病毒、山羊痘病毒、绵羊痘病毒和伪狂犬病病毒)检测结果为阴性,说明所建立的 ddPCR 方法的特异性好。

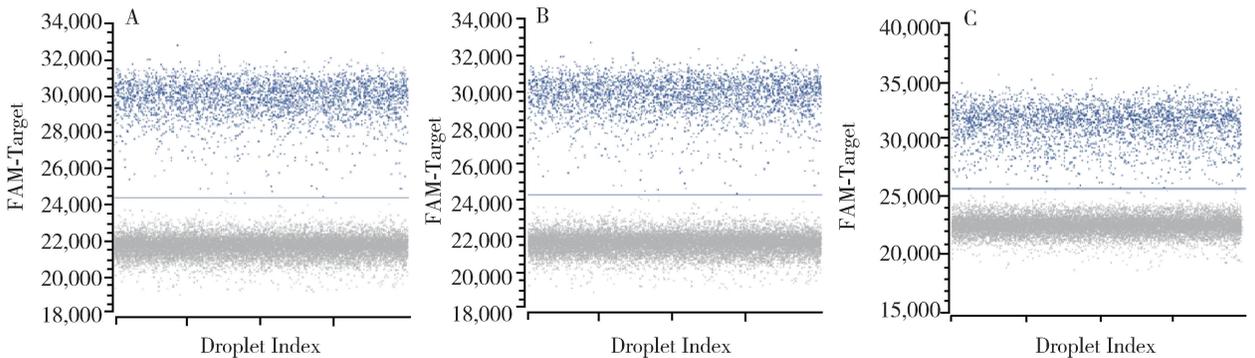
2.5 重复性试验 取两份 PPRV (Clone 9 株) 核糖核酸标准物质,分别提取核酸后,使用 ddPCR 检测,各做 3 次重复性检测,结果见表 2,变异系数为 1.8%,表明所建立的 ddPCR 方法有较好的可重复性。



A:退火温度为 55 °C ; B:退火温度为 58 °C ; C:退火温度为 60 °C ; D:退火温度为 65 °C

图 2 ddPCR 方法退火温度的优化

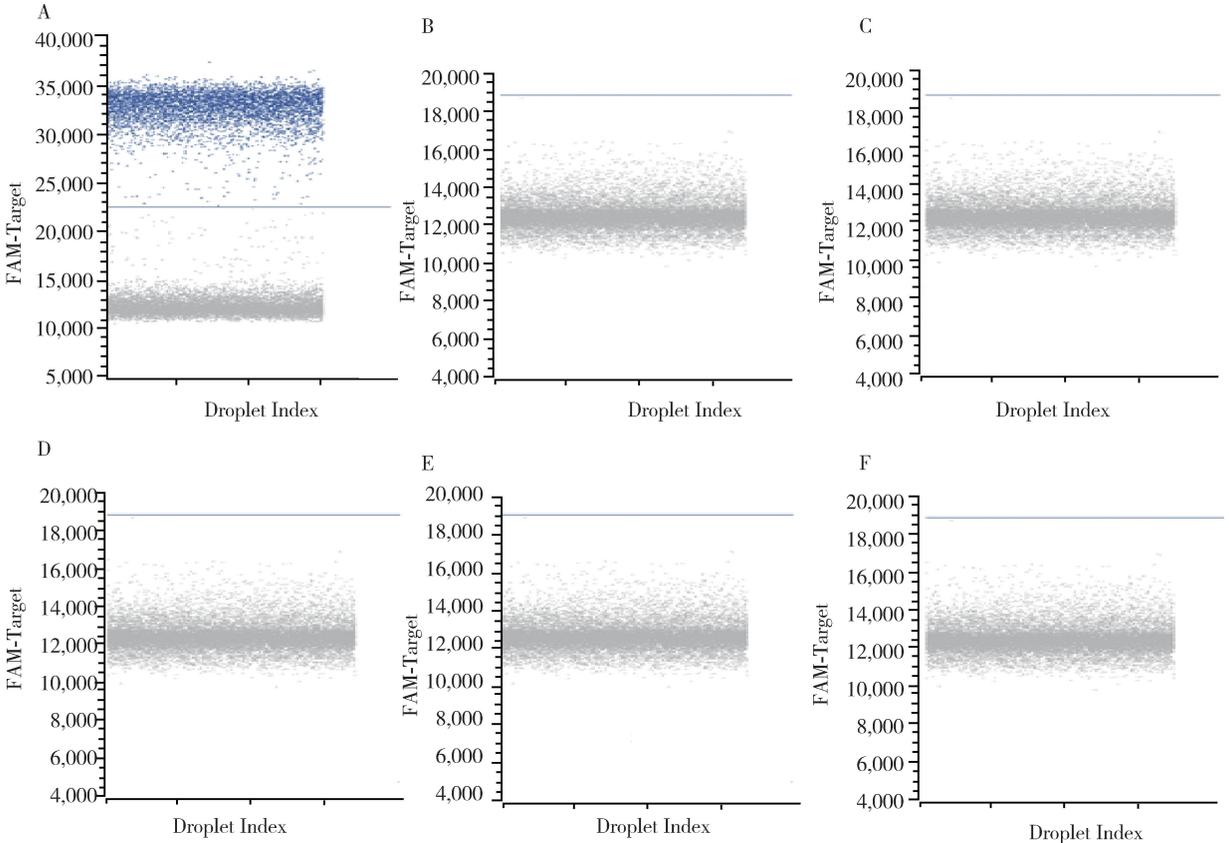
Fig 2 Optimization of annealing temperature for the ddPCR assay



A:升降温速率为 1.0 °C/s ; B:升降温速率为 2.0 °C/s ; C:升降温速率为 3.0 °C/s

图 3 ddPCR 方法升降温速率的优化

Fig 3 Optimization of temperature ramp rates for the ddPCR assay



A: 小反刍兽疫病毒 (Peste des petits ruminants virus); B: 口蹄疫灭活疫苗 (Foot - and - mouth disease inactivated vaccine); C: 狂犬病病毒 (Rabies virus); D: 山羊痘病毒 (Goat pox virus); E: 绵羊痘病毒 (Sheep pox virus); F: 伪狂犬病病毒 (Pseudorabies virus)

图 4 特异性试验扩增曲线

Fig 4 The amplification curve of specificity test

表 2 ddPCR 方法的重复性检测

Tab 2 Duplication test of the ddPCR assay

样品	N 基因拷贝数/(10 ³ · μL ⁻¹)			均值	标准差	变异系数
	1	2	3			
1	3.02	3.12	3.14	3.12	0.06	1.8%
2	3.12	3.16	3.17			

2.6 敏感性试验 通过 ddPCR, 得到 10⁰、10⁻¹、10⁻² 和 10⁻³ 稀释度核酸的拷贝数 (表 3), 以稀释梯度的对数为纵坐标、log (拷贝数) 为横坐标绘制曲线, 确定 ddPCR 方法的线性扩增范围, 结果如图 5,

计算出 R² = 0.9976 > 0.99, 线性关系良好, 线性动态范围灵敏度为 4.33 × 10⁰ ~ 2.81 × 10⁴ 拷贝/μL, 最低检测下限为 4.33 拷贝/μL。

表 3 倍比稀释 (10 倍) 样本 ddPCR 检测结果

Tab 3 ddPCR detection results of 10 - fold dilution samples

稀释梯度	N 基因拷贝数/μL			
	1	2	3	均值
10 ⁰	2.82 × 10 ⁴	2.84 × 10 ⁴	2.77 × 10 ⁴	2.81 × 10 ⁴
10 ⁻¹	2.25 × 10 ³	2.24 × 10 ³	2.29 × 10 ³	2.26 × 10 ³
10 ⁻²	1.00 × 10 ²	8.50 × 10 ¹	8.20 × 10 ¹	8.90 × 10 ¹
10 ⁻³	4.00 × 10 ⁰	4.00 × 10 ⁰	5.00 × 10 ⁰	4.33 × 10 ⁰

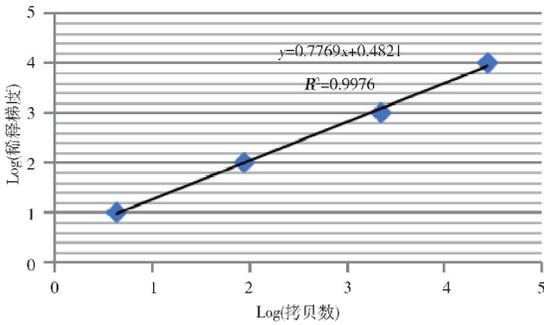
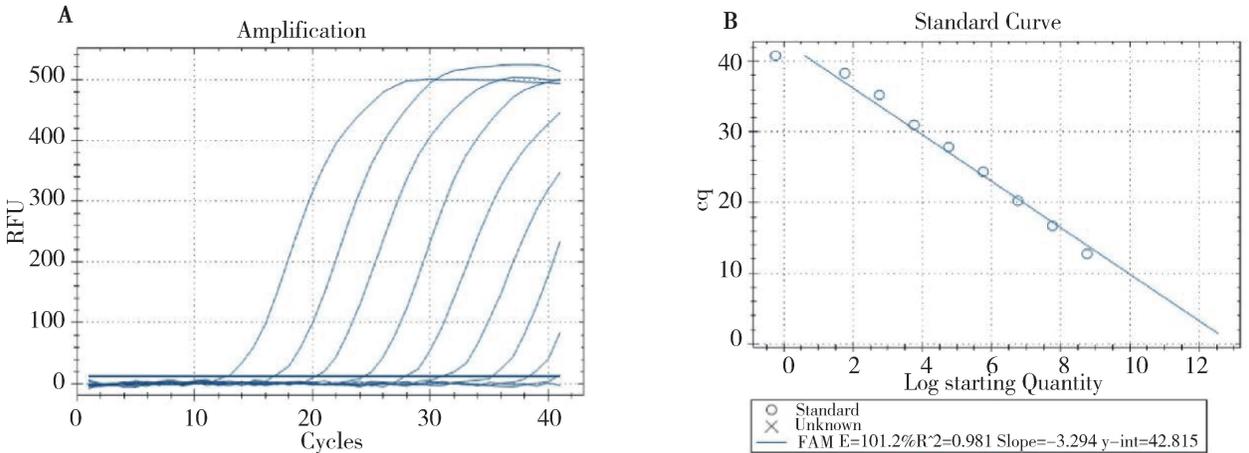


图 5 ddPCR 梯度稀释线性图

Fig 5 Linearity plot of ddPCR gradient dilution

2.7 qPCR 方法的敏感性试验 根据公式计算重组质粒拷贝数为 5.73×10^8 拷贝/ μL 。将标准品质粒 10 倍系列稀释,取原液、 $10^{-1} \sim 10^{-8}$ 稀释度作为

模板,进行 qPCR 试验。通过各稀释度标准品质粒的 Ct 值,确定该方法的灵敏度,同时以 \log (拷贝数)为横坐标,Ct 值为纵坐标绘制标准曲线。各稀释度标准品质粒扩增结果如图 6A 所示, 10^{-7} 稀释度的标准品质粒(即 57.3 拷贝/ μL)存在特异性扩增曲线,Ct 值为 38.35, 10^{-8} 稀释度的标准品质粒(即 5.73 拷贝/ μL)及阴性对照不存在特异性扩增曲线,未检测到 Ct 值,因此,qPCR 方法基因拷贝数检测灵敏度为 57.3 拷贝/ μL ,比上述 ddPCR 方法的灵敏度低 10 倍。标准曲线如图 6B 所示:扩增效率 $E = 101.2\%$,相关系数 $R^2 = 0.981$,标准曲线方程 $Y = -3.294X + 42.815$,Y 为 Ct,X 为 \log (拷贝数)。



A: qPCR 方法基因拷贝数灵敏度的检测;B: qPCR 方法标准曲线的建立

A: Detection of the gene copy number sensitivity by qPCR assay; B: Establishment of a standard curve for qPCR assay

图 6 qPCR 方法拷贝数灵敏度检测及标准曲线的建立

Fig 6 The gene copy number sensitivity test and generation of standard curve of the qPCR assay

2.8 PPRV(Clone 9 株)核糖核酸标准物质的定量 9 家单位使用本研究所建立的 ddPCR 方法对 PPRV(Clone 9 株)核糖核酸标准物质定量的数值见表 4,9 家单位各组测量数据组间变异系数小于 5%,说明所建立的 ddPCR 方法定量准确,可用于 PPRV 核糖核酸标准物质的定量。

3 讨论

小反刍兽疫已成为制约我国乃至全球畜牧业尤其是养羊业健康发展的重大病种,《国家中长期动物疫病防治规划》将小反刍兽疫列为重点防范的

13 种外来动物疫病之一,《全国畜禽遗传改良计划》将其列为种畜净化病种。2007 年 7 月和 2013 年 11 月,小反刍兽疫两次传入我国境内^[16-17]。截至 2015 年底,疫情已蔓延至全国 20 多个省份,严重影响我国国际贸易和经济发展^[18]。2021 年全国共报告发生 14 起疫情,且我国周边国家疫情形势不明朗^[19],疫情传入风险持续存在。我国采用免疫、扑杀、移动控制等综合措施防控小反刍兽疫,显然,早期快速的诊断技术将有利于小反刍兽疫综合防控措施地开展。

表 4 9 家单位 PPRV (Clone 9 株) 核糖核酸标准物质定量数据

Tab 4 Quantitative data of ribonucleic acid reference material of PPRV Clone9 strain in 9 institutions

单位	N 基因拷贝数/(10 ³ · μL ⁻¹)						均值	标准差	变异系数
	1-1	1-2	1-3	2-1	2-2	2-3			
A	3.02	3.02	3.12	3.12	3.12	3.17	3.09	0.06	2.0%
B	3.10	3.14	3.21	3.21	3.22	3.26	3.19	0.06	1.8%
C	2.86	2.90	2.98	3.04	3.04	3.10	2.99	0.09	3.0%
D	3.13	3.14	3.20	3.23	3.23	3.24	3.19	0.05	1.6%
E	2.90	3.03	3.14	3.16	3.18	3.22	3.11	0.12	3.7%
F	3.11	3.12	3.23	3.25	3.28	3.30	3.21	0.08	2.5%
G	2.94	2.94	3.00	3.02	3.02	3.06	3.00	0.05	1.7%
H	3.02	3.09	3.16	3.17	3.18	3.22	3.14	0.07	2.3%
I	2.90	3.04	3.06	3.15	3.16	3.27	3.10	0.13	4.1%

针对麻疹病毒属各成员 N 基因全基因序列比对发现,Clone9 株 N 基因核苷酸序列与国内及国外流行 PPRV 毒株 N 基因同源性均在 90% 之上,与麻疹病毒属其他病毒比较,同源性不超过 70%,说明 N 基因在麻疹病毒属各病毒内保守,因此 N 基因常作为 PPRV 分子生物学检测的靶标基因。普通 PCR 技术因其操作简单被广泛应用于 PPRV 核酸的检测^[10],同时产生了可对多种病原同时检测的多重 PCR 技术^[20],但由于这两种方法仅可定性检测,且灵敏度较低,逐渐被 qPCR 技术替代。qPCR 技术分为染料法和探针法,染料法成本低但容易出现假阳性,而探针法因其可实现定量检测、特异性强、灵敏度高而被广泛应用,但其定量依赖标准曲线,标准品的缺乏导致无法评价不同研究者所建立 qPCR 的灵敏度^[21-23]。近年来,可实现高通量、微量检测、绝对定量的 dPCR 技术已广泛应用到病原检测^[12-13]、标准物质定值^[14-15]等领域,目前已更新出微孔板系统、微流控芯片系统和微滴系统^[24],如杨鸣发等^[25]建立了灵敏度比 qPCR 高 100 倍的基于微流控系统的芯片式数字 PCR (Chip digital PCR, cdPCR),而我们所建立的 ddPCR 方法比 qPCR 的灵敏度高 10 倍。虽然 dPCR 具有特异性强、灵敏度高的优点,但目前高成本的相关耗材及仪器设备限制了其推广及应用。此外,也有很多以 N 基因为靶标建立的各种分子生物学检测技术,

如环介导等温扩增 (Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)^[26]、重组酶聚合酶扩增技术 (Recombinase polymerase amplification, RPA)^[27]等,虽存在等温、结果读取方式多样等优点,但也存在稳定性不足、易出现假阳性及临床应用尚不成熟等缺点。

与时俱进,将新型检测技术应用于 PPRV 的检测,势必可以推动 PPRV 检测的高通量、高特异性、便捷化、低成本和可视化。本研究所建立的特异性强、重复性好、灵敏度高、可实现绝对定量的 ddPCR 方法,也为 PPRV 的诊断及绝对定量提供了技术支持。

参考文献:

- [1] Mao L, Li W, Hao F, et al. research progress on emerging viral pathogens of small ruminants in china during the last decade [J]. Viruses, 2022, 14(6): 1-23.
- [2] Singh R K, Balamurugan V, Bhanuprakash V, et al. Possible control and eradication of Peste des petits ruminants from India: technical aspects [J]. Veterinaria Italiana, 2009, 45(3): 449-462.
- [3] Balamurugan V, Sen A, Venkatesan G, et al. Peste des petits ruminants virus detected in tissues from an Asiatic lion (*Panthera leo persica*) belongs to Asian lineage IV [J]. Journal of Veterinary Medical Science, 2012, 13(2): 203-206.
- [4] Rahman A U, Dhama K, Ali Q, et al. Peste des petits ruminants in large ruminants, camels and unusual hosts [J]. The Veterinary Quarterly, 2020, 40(1): 35-42.
- [5] Ratta B, Pokhriyal M, Singh S K, et al. Detection of Peste des

- petits ruminants virus (PPRV) genome from nasal swabs of dogs [J]. *Current Microbiology*, 2016, 73(1): 99 – 103.
- [6] Galbraith S E, McQuaid S, Hamill L, *et al.* Rinderpest and Peste des petits ruminants viruses exhibit neurovirulence in mice [J]. *Journal of Neurovirology*, 2002, 8(1): 45 – 52.
- [7] Nawathe D R and Taylor W P. Experimental infection of domestic pigs with the virus of Peste des petits ruminants [J]. *Tropical Animal Health and Production*, 1979, 11(2): 120 – 122.
- [8] Njeumi F, Bailey D, Soula J J, *et al.* Eradicating the scourge of Peste des petits ruminants from the world [J]. *Viruses*, 2020, 12(3):313.
- [9] Legnardi M, Raizman E, Beltran – Alcrudo D, *et al.* Peste des petits ruminants in Central and Eastern Asia/West Eurasia: Epidemiological situation and status of control and eradication activities after the first phase of the PPR global eradication programme (2017 – 2021) [J]. *Animals (Basel)*, 2022, 12(16):2030.
- [10] Couacy – hymann E, Hurard C, Guillou J, *et al.* Rapid and sensitive detection of Peste des petits ruminants virus by a polymerase chain reaction assay [J]. *Journal of Virological Methods*, 2002, 100(1/2):17 – 25.
- [11] Wagner K, Fox P, Gordon E, *et al.* A multiplexed, paired – pooled droplet digital PCR assay for detection of SARS – CoV – 2 in saliva [J]. *Scientific Reports*, 2023, 13(1): 3075.
- [12] Li H Y, Bai R L, Zhao Z Y, *et al.* Application of droplet digital PCR to detect the pathogens of infectious diseases [J]. *Bioscience Reports*, 2018, 38(6): BSR20181170.
- [13] Liu Y K, Han X Y, Zhang X R, *et al.* Development of a droplet digital PCR assay for detection of group A porcine rotavirus [J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2023, 10: 1113537.
- [14] Yang J Y, Guo R H, Li H J, *et al.* Development of highly accurate digital PCR method and reference material for monkeypox virus detection [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2023, 415(7): 1333 – 1337.
- [15] Niu C Y, Dong L H, Zhang J J, *et al.* Reference material development for detection of human respiratory syncytial virus using digital PCR [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2023, 415(16): 3131 – 3135.
- [16] Wang Z, Bao J, Wu X, *et al.* Peste des petits ruminants virus in Tibet, China [J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2009, 15(2): 299 – 301.
- [17] Wu X, Li L, Li J, *et al.* Peste des petits ruminants viruses re – emerging in China, 2013 – 2014 [J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2016, 63(5): e441 – e446.
- [18] Zhu Z, Zhang X, Adili G, *et al.* Genetic characterization of a novel mutant of Peste des petits ruminants virus isolated from Capra ibex in China during 2015 [J]. *Biomed Research International*, 2016, 2016:7632769.
- [19] Zhang S, Liang R, Yang Q, *et al.* Epidemiologic and import risk analysis of Peste des petits ruminants between 2010 and 2018 in India [J]. *BMC Veterinary Research*, 2022, 18(1): 419.
- [20] 王璐瑶, 宫英闲, 郝雪飘, 等. 山羊痘病毒与小反刍兽疫病毒双重 PCR 检测方法的建立 [J]. *中国动物检疫*, 2019, 36(11): 72 – 76.
- Wang L Y, Gong Y L, Hao X P, *et al.* Establishment of a duplex PCR assay for detection of goat pox virus and Peste des petits ruminants virus [J]. *China Animal Health Inspection*, 2019, 36(11): 72 – 76.
- [21] Abera T, Thangavelu A, Joy Chandran N D, *et al.* A SYBR Green I based real time RT – PCR assay for specific detection and quantitation of Peste des petits ruminants virus [J]. *BMC Veterinary Research*, 2014, 10: 22.
- [22] Batten C A, Banyard A C, King D P, *et al.* A real time RT – PCR assay for the specific detection of Peste des petits ruminants virus [J]. *Journal of Virological Methods*, 2011, 171(2): 401 – 404.
- [23] Halecker S, Mettenleiter C, Beer M, *et al.* “Fast – Check^{FLI} PPR – like” – a molecular tool for the fast genome detection of PPRV and differential diagnostic pathogens [J]. *Viruses*, 2020, 12(11): 1227.
- [24] Tan L L, Loganathan N, Agarwalla S, *et al.* Current commercial dPCR platforms: technology and market review [J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2023, 43(3): 433 – 464.
- [25] 杨鸣发, 马云云, 于志亚, 等. 小反刍兽疫病毒芯片式数字 PCR 检测方法的建立及应用 [J]. *中国动物检疫*, 2021, 38(12): 91 – 98.
- Yang M F, Ma Y Y, Yu Z Y, *et al.* Development and application of a chip digital PCR assay for PPRV [J]. *China Animal Health Inspection*, 2021, 38(12): 91 – 98.
- [26] Rajko N P, Flannery J, Arnold H, *et al.* A rapid RT – LAMP assay for the detection of all four lineages of Peste des petits ruminants virus [J]. *Journal of Virological Methods*, 2019, 274: 113730.
- [27] Li Y, Li L, Fan X, *et al.* Development of real – time reverse transcription recombinase polymerase amplification (RPA) for rapid detection of Peste des petits ruminants virus in clinical samples and its comparison with real – time PCR test [J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 17760.