



禽痘病毒微滴数字PCR检测方法的建立及应用

张熠帆¹, 韩笑^{2,3}, 张叶娜², 孔朋莉², 宋厚辉¹, 张晓峰², 王晓杜¹, 帅江冰^{2*}

(1. 浙江农林大学动物科技学院·动物医学院, 杭州 311300; 2. 浙江省检验检疫科学技术研究院, 杭州 310016;

3. 浙江大学动物科学学院, 杭州 310058)

摘要: 旨在建立一种禽痘病毒(fowlpox virus, FWPV)微滴式数字聚合酶链式反应(digital droplet PCR, ddPCR)检测方法。本研究通过对反应体系优化,包括引物和探针浓度的优化、退火温度的优化等步骤,进行重复性、敏感性、特异性试验,建立了较为完整的ddPCR反应体系。本方法确定FWPV ddPCR反应体系最佳引物浓度为900 nmol·L⁻¹,最佳探针浓度为200 nmol·L⁻¹,且在55℃反应条件下,ddPCR检测结果最优;本方法与其他常见禽类病毒无交叉反应,特异性强;本方法重复性好,批间与批内变异系数均小于10%。本ddPCR方法最低检测限为2.37拷贝·反应⁻¹。采用建立的ddPCR检测方法和行业标准(SN/T 1226—2015)检测方法对80份模拟样本进行检测,其中8份作为阴性,其余72份样品作为模拟感染样品,符合率为100%,比行业标准套式PCR方法符合率高出75%。在25份人工攻毒样本中,ddPCR对阳性样本的检出率达100%,行业标准套式PCR方法对阳性样本的检出率为33.3%。本方法的建立为检测禽及其肉制品中禽痘病毒提供了痕量精准检测方法,为降低禽痘对禽类养殖产业风险带来保障。

关键词: 禽痘病毒;微滴数字PCR;定量检测

中图分类号: S852.659.1

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2026)01-0337-12

Establishment and Application of a Droplet Digital PCR Assay for Fowlpox Virus

ZHANG Yifan¹, HAN Xiao^{2,3}, ZHANG Yena², KONG Pengli², SONG Houhui¹, ZHANG Xiaofeng²,
WANG Xiaodu¹, SHUAI Jiangbing^{2*}

(1. College of Animal Science and Technology·College of Veterinary Medicine, Zhejiang Agriculture & Forestry University, Hangzhou 311300, China; 2. Zhejiang Academy of Science and Technology for Inspection and Quarantine, Hangzhou 310016, China; 3. College of Animal Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract: A microdroplet digital polymerase chain reaction (ddPCR) method for the detection of fowlpox virus (FWPV) was established. In this study, a more complete ddPCR reaction system was established through the optimization of the reaction system, including the optimization of primer and probe concentrations, the optimization of annealing temperature and other steps, and reproducibility, sensitivity, and specificity experiments. In this method, the optimal primer concentration was determined to be 900 nmol·L⁻¹, the optimal probe concentration was 200 nmol·L⁻¹, and the results of ddPCR were optimized under the reaction condition of 55℃. The method showed no cross-reactivity with other common avian viruses and is highly specific. The reproducibility of the method is

收稿日期: 2025-04-09

基金项目: 国家重点研发计划(2021YFF0602803); 浙江省“尖兵”“领雁”研发攻关计划项目(2023C02022); 浙江省“尖兵领雁+X”研发攻关计划(2024C01137)

作者简介: 张熠帆, 硕士生, 主要从事畜禽病原检测方法研究, E-mail: 1765886314@qq.com

* 通信作者: 帅江冰, 主要从事口岸重要畜禽病原研究监测技术研究, E-mail: sjb@zaiq.org.cn

good, and the coefficients of variation between and within batches are less than 10%. The lowest detection limit of this ddPCR method was 2.37 copies per reaction. Using the established ddPCR detection method and the industry standard (SN/T 1226—2015) detection method for 80 samples, the coincidence rate was 100%, which was higher than the coincidence rate of 75% of the industry standard nested PCR method. In 25 artificially inoculated samples, the detection rate of ddPCR for positive samples reached 100%, while the detection rate of the nested PCR method specified in the industry standard for positive samples was 33.3%. The establishment of this method helps the relevant inspection and quarantine departments at ports to detect the FWPV in a timely manner and reduces the risk of the domestic poultry breeding industry by providing a more accurate and efficient detection method.

Keywords: fowlpox virus; droplet digital PCR; quantitation assay

*** Corresponding author:** SHUAI Jiangbin, E-mail: sjb@zaiq.org.cn

禽痘(fowlpox)是由禽痘病毒(fowlpox virus, FWPV)引起的一种可感染家禽和野生鸟类的高传染性疾病,在野生鸟类中通过重组、突变等出现的新型禽痘病毒感染养殖家禽的风险也大大提高^[1]。其典型特征是皮肤非羽毛区域的结节性皮肤病变,在组织学上的典型特征是表皮的显著增生,产生特征性的皮肤结节,这是由肿胀和棘层细胞数量增加引起的^[2-3]。FWPV主要通过气溶胶和虫媒叮咬等方式在禽类中水平传播,吸入飞沫、灰尘可导致口腔、咽喉部更严重的感染,即所谓的“白喉感染”(俗称“湿痘”),其临床特征是呼吸道黏膜出现纤维坏死、增生性病变^[4-5]。与其他呼吸道感染疾病尤其是传染性喉气管炎类似,因而造成临床诊断困难。现在常用的禽痘病毒分子生物学诊断方法有限制性片段长度多态性(RFLP)、PCR、Southernblot杂交等方法^[6],其中普通的PCR使用最多,但其较为繁琐且灵敏度不高。预防禽痘感染的主要方法是接种疫苗,此方法在产蛋鸡中得到广泛应用^[7]。此外,禽痘病毒与其他传染性病原体同时感染可能会增加受感染鸟类疾病的严重程度和病程^[8]。因此,快速且特异性地检测出禽痘病毒对切断禽痘病毒的传播及其可能对禽类所构成威胁具有重要意义。

FWPV的常见诊断方法有组织病理学检查、病毒分离、血清学方法和核酸检测^[9],目前国内检验检疫行业标准采用套式PCR法进行检测。此外,文献中描述了基于PCR的FWPV检测方法,如Mapaco等^[10]使用普通PCR检测FWPV的疑似样本;Murer等^[11]对鸚鵡中气管碎片和眼周皮肤进行PCR检测;Matos等^[12]使用real-time PCR鉴别FWPV和网状

内皮组织增生症病毒;Tadese等^[13]使用real-time PCR鉴别携带网状内皮组织增生症病毒序列的禽痘病毒。然而,上述的检测方法均无法实现对FWPV直接定量。数字PCR(digital polymerase chain reaction, dPCR)是继普通PCR、实时荧光定量PCR(quantitative real-time PCR, qPCR)之后发展起来的第三代PCR技术,具有准确性好、耗时短,无需依赖标准品即可实现对目标分子绝对定量等优势^[14-17],在病原检测领域微滴式数字PCR(droplet digital PCR, ddPCR)技术应用更为广泛,在多种动物源性病原的核酸检测技术中得到应用,例如已开发了布鲁氏菌、非洲猪瘟病毒等多种病原的ddPCR检测技术^[18-21]。在禽病检测中,现已报道鸡传染性贫血病毒、禽流感病毒ddPCR检测方法^[22-24],然而,目前ddPCR技术尚未应用于禽痘病毒检测。

ddPCR通过油膜将水性PCR反应液包裹其中,生成稳定的油性微滴,以此在独立微滴中形成单一PCR反应体系,随后微滴完成PCR扩增,最后微滴分析仪对微滴逐个进行荧光检测^[25-27]。相比阴性微滴,包含至少一个目标核酸分子的阳性微滴的荧光信号强度增加,统计阴性和阳性微滴的数目后通过统计学泊松分布方法分析就能计算出原始样品中目标核酸分子的拷贝数^[28-30]。

本研究以ddPCR技术为基础,通过优化反应条件并进行重复性、敏感性和特异性试验建立禽痘病毒微滴式数字PCR检测方法,该方法具有高灵敏度和高特异性,能够实现对禽痘病毒的快速定量检测,为禽痘病毒的早期防控及精准检测提供新方法。

1 材料与方法

1.1 病毒

传染性喉气管炎病毒(infectious laryngo tracheitis virus, ILTV)、鸡传染性法氏囊病毒(infectious bursal disease virus, IBDV)活疫苗 B87 株、鸡马立克病火鸡疱疹病毒(Marek's disease virus, MDV)活疫苗 FC-126 株和鸭瘟病毒(duck plague virus, DPV)活疫苗 CVCC AV1222 株由浙江迪普诊断技术有限公司惠赠;禽痘病毒 FWPV 分离株(JH-1)由浙江省农业科学院惠赠。

1.2 材料与试剂

天隆磁珠法核酸提取试剂盒购自天隆科技有限公司;ddPCR Supermix for Probes (No dUTP)、ddPCR Oils 购自伯乐(上海)生命科学研究发展有限公司;引物、探针及质粒由生工生物工程(上海)股份有限公司合成;2× Phanta Flash Master Mix (Dye Plus)购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司。

表 1 PCR 引物和探针

Table 1 PCR primers and probes

引物/探针 Primer/probe	序列(5→3') Sequence	位置 Position	长度/bp Product
FWPV-F	AGAAAACGAAGCGTCGCAATAGC	88 824—88 846	132
FWPV-R	ATTGTGGCCGCGCTTAACGGTG	88 715—88 736	
FWPV-P	TTCACGCAAATAGCTGTCAAACCTGG	88 797—88 821	/
FWPV-1	CAGCAGGTGCTAAACAACAA	201 978—201 997	558
FWPV-2	CGGTAGCTTAACGCCGAATA	201 420—201 439	
FWPV-3	ACGACCTATGCGTCTTC	201 962—201 978	419
FWPV-4	ACGCTTGATATCTGGATG	201 560—201 577	

1.5 病毒核酸提取

使用天隆磁珠法核酸提取试剂盒在 GeneRotex 96 全自动核酸提取仪中进行禽痘(FWPV)、传染性喉气管炎病毒(ILTV)、鸡传染性法氏囊病毒(IBDV)、鸡马立克病毒(MDV)、鸭瘟病毒(DPV)的核酸提取,提取好的病毒核酸于-20℃保存备用。

1.6 标准质粒构建

FWPV 质粒标准品,测定其浓度,根据公式:拷贝浓度(拷贝·反应⁻¹)=[6.02×10²³×(质粒浓度 ng·μL⁻¹×10⁻⁹)]×反应体积/[DNA 长度(bp)×660],本研究中反应体系为 20 μL,经 ddH₂O 稀释后,测定其初始浓度为 3×10¹¹ 拷贝·反应⁻¹,于

1.3 仪器与设备

天隆磁珠法核酸仪(天隆科技有限公司);NanoDrop spectrophotometer 超微量分光光度计(Thermo Fisher);AuTo DG 自动微滴生成器[伯乐(上海)生命科学研究发展有限公司];T100TMPCR 仪[伯乐(上海)生命科学研究发展有限公司];PX1 微孔板封膜仪(Bio-red);QX 600 数字微滴 PCR 仪(伯乐)。

1.4 引物、探针的设计与合成

通过比对 20 个不同地区来源的 FWPV TK1 基因序列,发现 TK1 的序列高度保守,其同源性的 100%,根据 GenBank 上 FWPV 的 TK1 基因序列(基因号:MH709125),选择保守区域^[31-32],再根据 ddPCR 反应所需条件进行引物(FWPV-F、R)、探针(FWPV-P)设计,将设计引物、探针序列(表 1)通过 NCBI BLAST 工具进行特异性比对。在生工生物工程(上海)股份有限公司合成后使用。行业标准 SN/T 1226—2015 禽痘检疫技术规范^[33]套式 PCR 的引物为 FWPV-1、FWPV-2、FWPV-3 和 FWPV-4。

-20℃保存备用。

1.7 微滴数字 PCR 反应条件优化

将 FWPV 质粒标准品稀释后,以 1×10⁴ 拷贝·反应⁻¹浓度的 FWPV 阳性质粒为模板,进行 ddPCR 反应并优化引物和探针浓度。根据不同的引物浓度(300、500、700 和 900 nmol·L⁻¹)和不同的探针浓度(100、200 和 400 nmol·L⁻¹),两两组合进行 ddPCR 反应,使用棋盘法确定最优引物和探针浓度,随后在 54~61℃的温度区间对引物退火温度进行优化。

1.8 重复性试验

使用 10 倍比稀释的 FWPV 阳性质粒(10¹~10⁵ 拷贝·反应⁻¹)进行 ddPCR 反应,每个浓度设置

16 个重复, 计算每个浓度相应的变异系数 (coefficient of variation, CV), 用于评估该体系的批内重复性。同时用上述质粒分别在 4 个不同的时间进行批间检测 ($n=4$), 计算 4 批次试验的 CV, 以此评估该体系的批间重复性。

1.9 敏感性试验

为确定本 ddPCR 方法敏感性, 将 FWPV 标准质粒分别稀释为 1×10^3 、 1×10^2 、 1×10^1 、7.5、5、2.5 和 1 拷贝·反应⁻¹ 共 7 个浓度梯度进行 ddPCR 检测, 各浓度重复 30 次, 计算每个稀释度相应的平均反应浓度 (mean concentration)、标准差 (standard deviation, SD) 和相对标准偏差 (relative standard deviation, RSD), 以 30 个重复均可检出且 $RSD \leq 25\%$ 的最低浓度为本方法检出 FWPV 最低定量限 (limit of quantification, LoQ)。为确定本 ddPCR 体系准确的最低检测限 (limit of detection, LoD), 根据可重复概率为 95% probit 回归模型, 计算本方法在 95% 置信区间 (95% confidence interval, 95% CI) 内的 LoD, 以此评估本 ddPCR 方法的敏感性。

1.10 特异性试验

以禽痘病毒 (FWPV)、传染性喉气管炎病毒 (ILTV)、鸡传染性法氏囊病毒 (IBDV)、鸡马立克病病毒 (MDV)、鸭瘟病毒 (DPV) 核酸为模板, 以 ddH₂O 为阴性对照, 进行 ddPCR 反应以验证 FWPV ddPCR 反应体系的特异性。

1.11 模拟样品检测

禽类感染 FWPV 后, 少毛或无毛的皮肤处 (像鸡冠部、鸡爪等部位) 会出现痘疹^[6], 所以选择鸡头、鸡翅根、鸡爪三个部位制备模拟样品。将浓度为 4.67×10^{12} 拷贝·反应⁻¹ 的禽痘分离株 JH-1 按 10 倍比稀释, 并与各部分的组织混匀后抽提核酸作为模拟阳性样本备用。现有 FWPV 检验检疫行业检测标准 (SN/T 1226—2015), 利用行标中的套式 PCR 检测方法与本研究建立 FWPV ddPCR 检测方法对模拟的阳性样品进行方法间比对, 定量样品中的病毒浓度并评估建立的体系在实际样品中的准确性。

1.12 人工攻毒及实际样品检测

选取 5 只 30 日龄的健康鸡进行禽痘病毒人工攻毒, 其中 3 只作为阳性鸡在翅膀内侧无血管处接种 200 μ L JH-1 毒株 (1×10^5 拷贝) 感染, 其余 2 只作为阴性对照注射同等体积生理盐水。攻毒 8 d 后阳性鸡均出现皮肤痘痂、呼吸阻塞等显著临床症状, 分别采集 5 只鸡的鸡冠、鸡爪、肺、肾脏和血液。取

样后将组织剪碎, 并用组织匀浆机充分匀浆, 吸取 100 μ L 上清提取核酸, 随后分别用 ddPCR 方法和 SN/T 检测方法进行检测。

为进一步应用建立的 ddPCR 检测方法, 随机选取 25 只 60 日龄鸡, 翼下静脉采血约 1 mL 获得 25 份血液样本, 提取核酸后分别用 ddPCR 和 SN/T 方法进行检测。

2 结果

2.1 反应条件优化

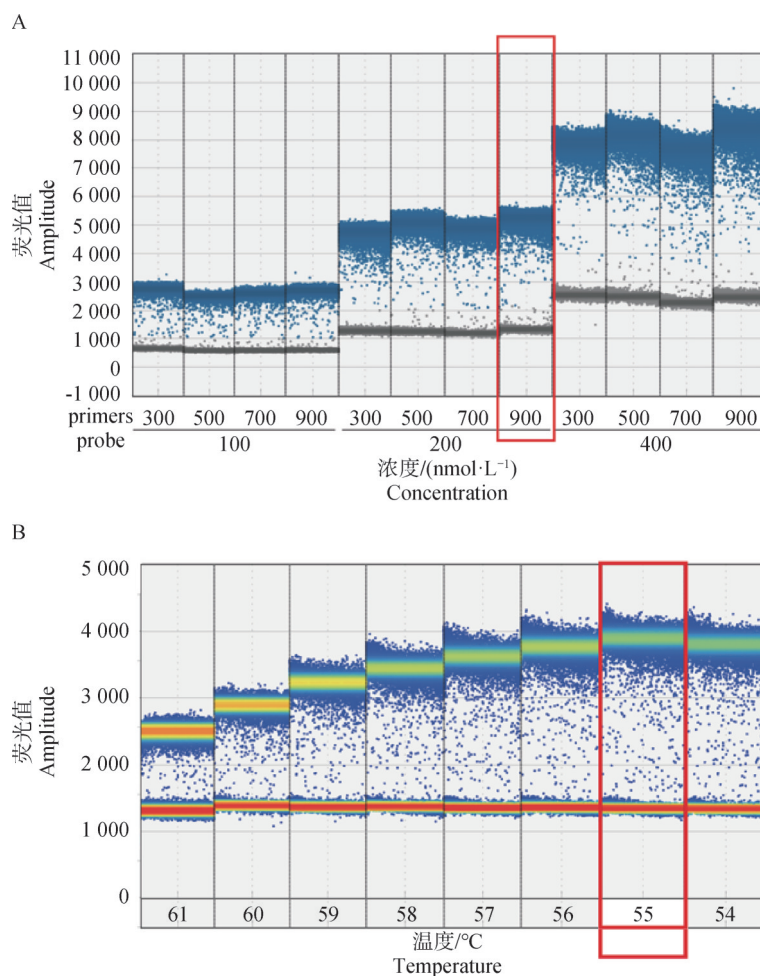
使用 10^4 拷贝·反应⁻¹ 浓度 FWPV 阳性质粒进行 ddPCR, 根据不同引物浓度 (300、500、700 和 900 nmol·L⁻¹) 和不同的探针浓度 (100、200 和 400 nmol·L⁻¹) 按照棋盘法进行试验。结果如图 1A 所示, 通过阴阳微滴离散程度确定最优引物和探针浓度分别为 900 和 200 nmol·L⁻¹。在上述最优引物和探针浓度下, 于 54~61 $^{\circ}$ C 对引物退火温度进行优化 (图 1B), 结果表明最优退火温度为 55 $^{\circ}$ C。最终确定所建立的 ddPCR 方法最适反应体系为 ddPCR Supermix for Probes (No dUTP) 10.0 μ L, 引物各 1.98 μ L (终浓度 900 nmol·L⁻¹) 探针 0.44 μ L (终浓度 200 nmol·L⁻¹), ddH₂O 3.6 μ L, 模板核酸 2.0 μ L。PCR 反应条件为 95 $^{\circ}$ C 10 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 1 min, 共 40 个循环; 98 $^{\circ}$ C 10 min; 4 $^{\circ}$ C 维持。

2.2 重复性试验

将 10 倍梯度稀释后浓度为 $10^1 \sim 10^5$ 拷贝·反应⁻¹ 的 FWPV 标准质粒进行 ddPCR 重复性试验, 每个浓度设置 16 个重复, 作为批内重复性检测。结果如图 2A 所示, 5 个浓度批内重复性变异系数 CV% 分别为 0.12%、0.21%、0.55%、1.35% 和 3.40%, 均小于 5%; 在 4 个不同时间, 将上述浓度质粒每个浓度设置 4 个重复进行批间重复性试验, 各浓度 4 批次间差异分别为 0.47%、0.64%、0.88%、1.52% 和 6.80%, 均小于 10%, 无显著差异 (图 2B), 以上结果表明本研究建立的 ddPCR 批内和批间重复性良好。

2.3 特异性试验

分别以 FWPV、ILTV、IBDV、MDV 和 DPV 基因组核酸为模板, 以 ddH₂O 为阴性对照, 验证 FWPV ddPCR 特异性。如图 3 所示, 本 ddPCR 体系仅对 FWPV 有显著扩增信号, 其余病毒核酸均未出现特异性扩增, 说明建立的 FWPV ddPCR 体系特异性良好, 与其他 4 种禽类病毒未出现交叉反应。

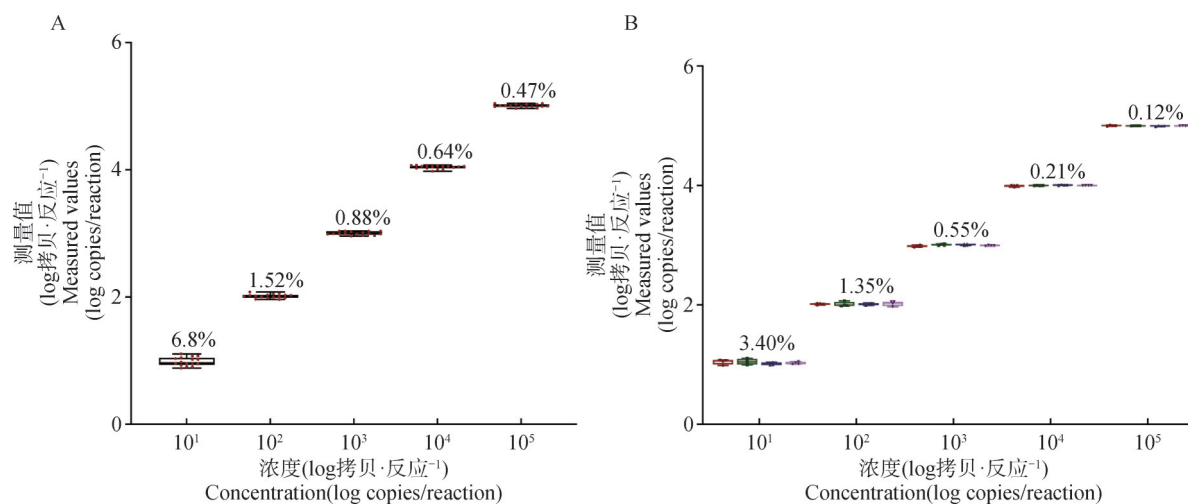


A. 引物探针浓度优化;B. 退火温度优化

A. Optimization of primer and probe concentrations; B. Temperature optimization

图1 ddPCR反应条件优化

Fig. 1 Optimization of ddPCR reaction conditions



A. 批内重复试验结果;B. 批间重复试验结果

A. Inter-assay repeatability; B. Intra-assay repeatability

图2 FWPV ddPCR重复性试验

Fig. 2 Repeatability assay of FWPV ddPCR

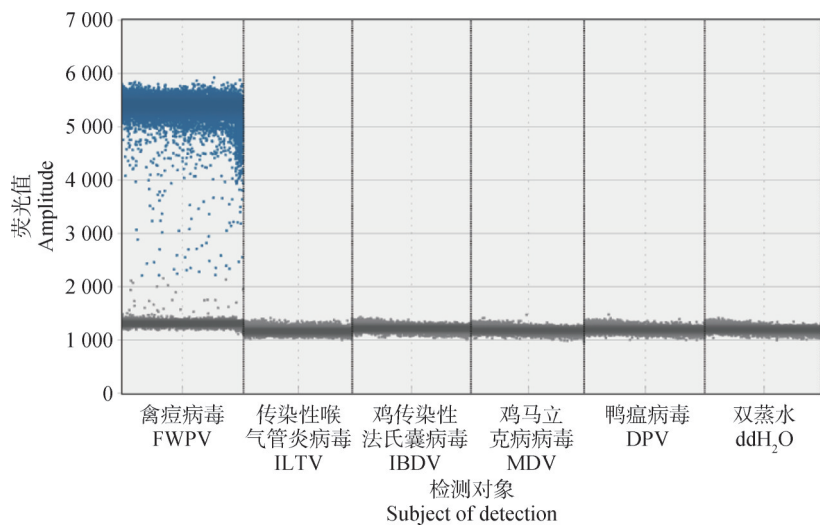


图3 FWPV 特异性试验

Fig. 3 Specificity of ddPCR for FWPV

2. 4 敏感性试验

使用 $10^3\sim10^0$ 拷贝·反应 $^{-1}$ 的FWPV 标准质粒通过建立的ddPCR 体系进行敏感性试验,重复检测30 次。检测结果如表2 所示,ddPCR 检测FWPV 的浓度为5 拷贝·反应 $^{-1}$ 。进一步计算ddPCR 的最低

检测限(LoD),建立重复概率为95% 的概率回归模型,结果得到 ddPCR LoD 为2.37 拷贝·反应 $^{-1}$ (95%CI:1.73~8.20 拷贝·反应 $^{-1}$)(图4),因此可以得出本ddPCR 方法在95% 置信区间的检测范围为2.37~ 10^5 拷贝·反应 $^{-1}$ 。

表2 敏感性试验

Table 2 Sensitivity of ddPCR

质粒浓度/(拷贝·反应 ⁻¹) Plasmids concentration (copies per reaction)	微滴式数字 PCR ddPCR		
	检测值($\bar{x}\pm s$)/(拷贝·反应 ⁻¹) Detected values ($\bar{x}\pm s$)/ (copies per reaction)	阳性/样本数 Positive/Reactions	相对标准偏差 RSD
10 ³	1 003.50 ± 61.43	30/30	0.88%
10 ²	103.73 ± 7.37	30/30	1.52%
10	9.80 ± 1.53	30/30	6.80%
7.5	8.32 ± 2.11	30/30	12.23%
5	5.83 ± 1.37	30/30	14.02%
2.5	ND	29/30	/
1	ND	22/30	/

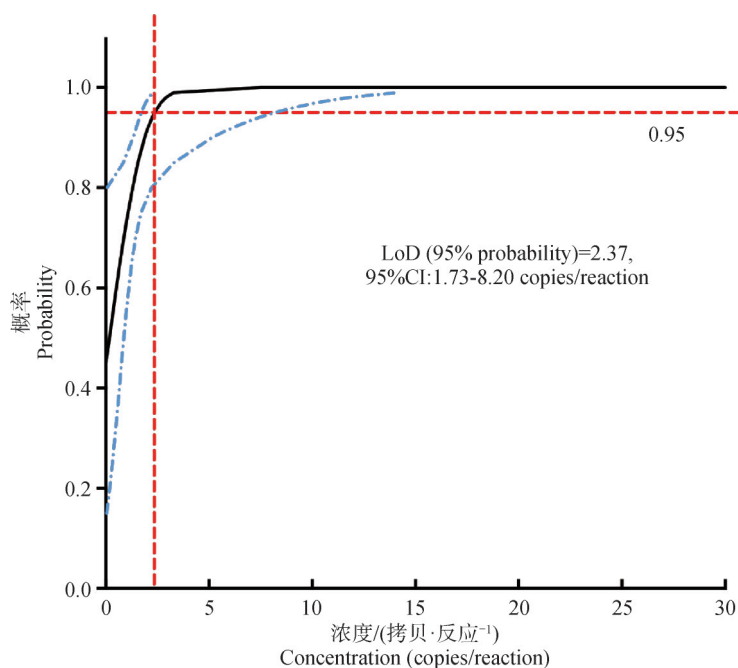
ND 表示未检出
ND stand for not detected

以 4.67×10^{12} 拷贝·反应 $^{-1}$ 浓度的FWPV 分离株 JH-1 基因组为模板,抽提基因组 DNA,进行10 倍稀释后用ddPCR 检测,试验结果如图5A 所示,在 4.67×10^2 拷贝·反应 $^{-1}$ 仍可检出。同时将上述浓度梯度的JH-1 毒株基因组作为模板,使用行业标准中套式 PCR 引物进行第一轮 PCR 扩增,当模板浓度稀释至 4.67×10^4 拷贝·反应 $^{-1}$ 时无法检出(图5B);继续使用行业标准中套式 PCR 引物进行第二

轮 PCR 扩增,在 4.67×10^2 拷贝·反应 $^{-1}$ 也可检出(图5C),表明所建立的ddPCR 法检测灵敏度达到和行业标准中套式 PCR 法相同水平(4.67×10^2 拷贝·反应 $^{-1}$),值得注意的是,与第一轮套式 PCR 检测结果(4.67×10^4 拷贝·反应 $^{-1}$)相比,ddPCR 法的检测灵敏度更高。

2. 5 模拟样品检测

根据FWPV 的感染部位,选择鸡头、鸡翅根、鸡

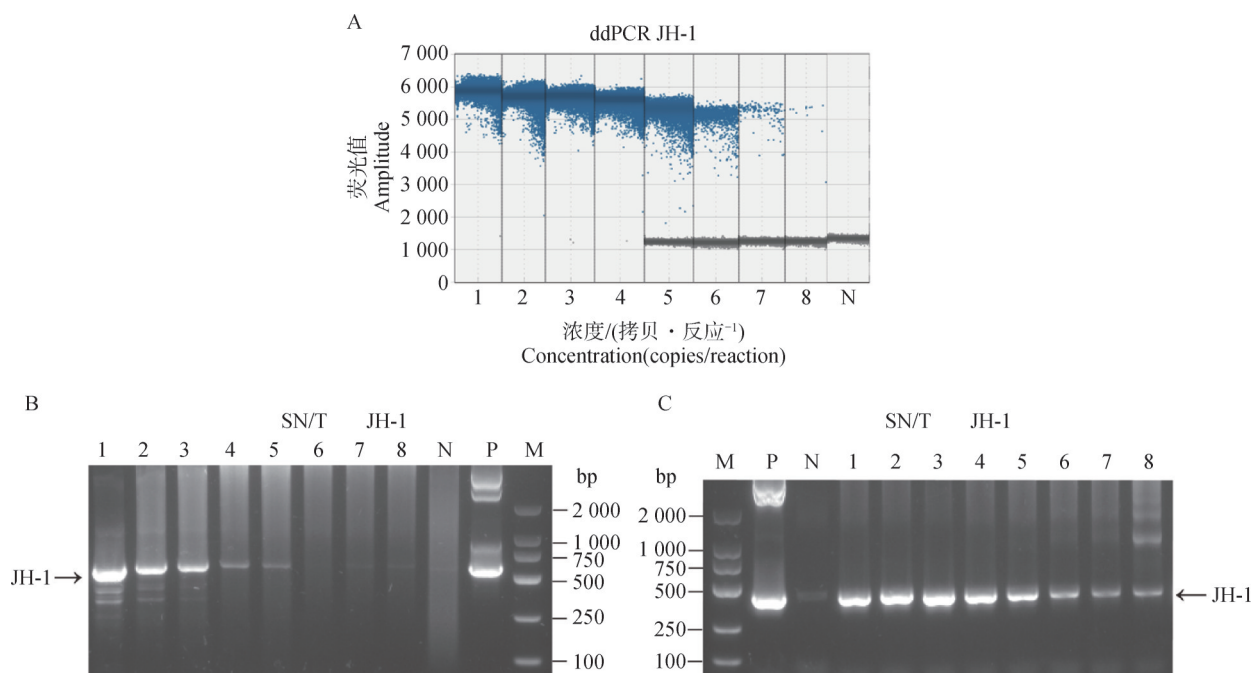


黑色为拟合曲线,蓝色虚线为95%置信区间拟合曲线,每个浓度进行30个重复

The black line represents probit curve. The blue dashed lines represent 95% confidence interval (95% CI). For each concentration, $n=30$

图4 Probit模型分析FWPV ddPCR的LoD

Fig. 4 Probit analysis sigmoid curve reporting the LoD of ddPCR



A. ddPCR 检测结果;B. 凝胶电泳检测第一轮PCR产物;C. 凝胶电泳检测第二轮PCR产物;图中标注的浓度1~8分别对应浓度 $4.67 \times 10^9 \sim 4.67 \times 10^2$ 拷贝·反应⁻¹;N. 阴性对照;P. 阳性对照;M. DNA 相对分子质量标准

A. Results of ddPCR test method; B. Gel electrophoresis detection of the first round of PCR products; C. Gel electrophoresis detection of the second round of PCR products; Concentrations 1-8 labeled in the figure correspond to concentrations $4.67 \times 10^9 \sim 4.67 \times 10^2$ copies per reaction; N. Negative control; P. Positive control; M. DNA marker

图5 ddPCR和套式PCR法检测FWPV

Fig. 5 Detection of FWPV by ddPCR and nested PCR methods

爪三个部位进行样品的模拟,其中每个浓度梯度模拟6份样品;样品匀浆后取出8份作为阴性,其余72份作为模拟感染样品,共80份样品,分别与 4.67×10^{10} 、 4.67×10^8 、 4.67×10^6 和 4.67×10^4 拷贝·反应⁻¹的四个浓度梯度的JH-1毒株充分混匀并抽提核酸(图6)。分别用建立好的ddPCR方法和SN/T检测方法对感染的样品进行检测,最终两种方法的检测符合率如表3所示,ddPCR的符合率100%(72/72),行标PCR的符合率25%(18/72),ddPCR方法比行业标准PCR方法符合率高出75%。

2.6 人工攻毒及实际样品检测

对5只健康鸡进行禽痘病毒人工攻毒,3只鸡接种JH-1毒株作为攻毒组,其余2只作为阴性对照注

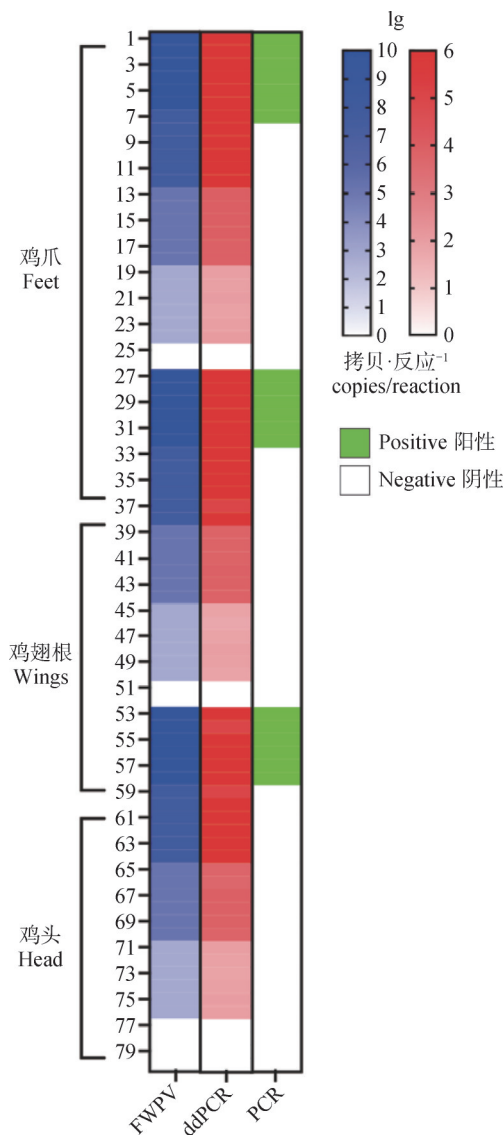


图6 ddPCR和套式PCR分别检测模拟样本
Fig. 6 ddPCR and nested PCR to detect samples

表3 模拟样本结果符合率
Table 3 Rate of compliance with results

结果 Results	方法 Method	
	PCR (SN/T 1226—2015)	微滴式数字PCR ddPCR
阳性 Positive	18	72
阴性 Negative	62	8
总数 Total	80	80
符合率/% Compliance rate	25	100

射生理盐水。8 d后阳性鸡出现典型临床症状,剖检后取鸡冠、鸡爪、肺部、肾脏和血液五个部分研磨并提取核酸。分别用ddPCR方法和SN/T检测方法进行检测。两种方法在攻毒组鸡组织样本中的阳性检出率如表4所示,其中ddPCR的检出率达100%(15/15),行标PCR法的检出率为33.3%(5/15),表明ddPCR方法较行业标准PCR方法检出率更高。表明本研究建立的FWPV ddPCR检测方法敏感性高于现有的SN/T检测方法,同时ddPCR可以直接对样品进行病毒核酸的绝对定量检测,ddPCR结果显示鸡冠和鸡爪中病毒含量最高(3×10^5 拷贝·反应⁻¹),而肺部、肾脏和血液病毒含量较低($1\times 10^1\sim 1\times 10^2$ 拷贝·反应⁻¹)。

除了检测上述模拟及人工感染样本外,从鸡养殖场随机选取25只鸡,进行翼下静脉采血,共获得25份血液样本。25份样本使用两种检测方法结果均为阴性。

3 讨论

检验检疫基层实验室检测场景的技术需求特征主要集中在小型化、快速检测、自动化、成本效益、环境适应性、多功能性和信息化等方面。这些需求反映了基层实验室检测在资源有限的情况下对高效、便捷检测技术的迫切需求^[34-35],而目前动物疫病检测也趋向基层化发展,其目的是及早发现预警并控制动物疫病的流行。ddPCR技术在灵敏度、特异性和检测通量等方面不断提升,广泛应用于疾病检测、肿瘤诊断等领域^[36-37],可以快速、准确地检测多种病原体。但与现阶段常用的普通PCR和qPCR检测相比,ddPCR在设备和试剂上还存在成

表4 实际样本结果检出率

Table 4 Detection rate of actual sample results

检测部位 Detection site	检出阳性数 Number of positive			
	攻毒组($n=3$) Challenge group		阴性组($n=2$) Negative group	
	ddPCR	PCR	ddPCR	PCR
鸡冠 Cockscomb	3/3	3/3	0/2	0/2
鸡爪 Foot	3/3	2/3	0/2	0/2
肺 Lung	3/3	0/3	0/2	0/2
肾脏 Kidney	3/3	0/3	0/2	0/2
血液 Blood	3/3	0/3	0/2	0/2
阳性检出率/% Positive detection rate	100(15/15)	33.3(5/15)	0(0/10)	0(0/10)

本较高、设备元器件制造工艺不完善的不足^[38],可通过反应试剂和设备国产化,来降低试剂成本、提高仪器普及度和制造工艺来克服这些局限性。目前,市售伯乐 ddPCR 进口试剂单孔反应成本在 100 元以上,而国产试剂成本相比进口试剂可控制在 50% 以内,但进口试剂在检测稳定性和样本普适性上可能仍不可替代。未来随着技术进一步成熟和政策支持加码,国产产品有望在更多领域实现进口替代,推动数字 PCR 技术的普及应用,同时相关技术自主国产化也有助于突破外部技术壁垒,防范不稳定国际贸易摩擦中的技术贸易手段,从而保障疫病检测的有序开展。

近年来,ddPCR 法已在禽病检测中得到应用,如蒋文明等^[22]建立了 H7 亚型禽流感病毒(avian influenza virus, AIV)的 ddPCR 检测方法,该方法对重组质粒标准品检测下限为 0.8 拷贝 $\cdot\mu\text{L}^{-1}$;Hopken 等^[23]能够预测 AIV 阳性样本中 AIV 的全基因组序列;Li 等^[24]使用 ddPCR 对鸡传染性贫血病毒(chicken anemia virus, CAV)进行定量检测,检测下限为 2.4 拷贝 $\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 。本研究建立的禽痘病毒 ddPCR 检测方法在上述文献中的方法类似,首次实现了对 FWPV 的直接定量,并表现出较高的灵敏度和特异性。

本研究使用 TK1 基因作为目标基因设计了引物和探针(表 1)。所建立的 ddPCR 检测方法通过一系列优化反应条件和体系,试验结果为批间和批内的 CV% 值均低于 10%(图 2),LoD 低至 2.37 拷贝 $\cdot\text{反应}^{-1}$ (图 4),表现出高度可重复性、敏感性和特异性,此外与其他常见禽病病毒不发生交叉反应,仅能检测出 FWPV(图 3);在对 FWPV 标准质粒进行敏感性检测时,ddPCR 法和行业检测标准进行对比,发现

第一轮 PCR 的结果为 ddPCR 法更敏感,第二轮 PCR 的结果为两种方法敏感度相同(图 5)。最后,为了进一步验证样品中检测的可行性,分别使用建立好的 ddPCR 方法和现有行业检测标准来检测 FWPV 在鸡不同部位的模拟样本,病毒浓度为 4.67×10^{10} 拷贝 $\cdot\text{反应}^{-1}$ 时,在两种检测方法中都可以稳定检测,检测值与理论值基本一致(图 6)。最终,ddPCR 的模拟样品符合率为 100%,行业标准检测方法的模拟样品符合率为 25%(表 3)。以上差异可能是由于普通 PCR 反应体系较大,杂质较多以及两轮 PCR、电泳等操作的干扰。在人工攻毒样本检测中,ddPCR 的阳性检出率达 100%,行业标准 PCR 法的阳性检出率为 33.3%(表 4),此外 ddPCR 检测结果提示除皮肤外,FWPV 还可在鸡的脏器和血液中普遍存在,而传统 PCR 检测难以对此类低载量病毒进行检测。因此 FWPV ddPCR 检测方法的建立有效地减少了上述因素对检测结果的影响,提高了稳定性和灵敏度,表明 ddPCR 在对低浓度 FWPV 的临床样本检测中具有良好的应用前景。

在我国,禽痘在南北方地区均有流行,且对集约化禽类养殖场构成威胁^[39]。现阶段禽痘病毒的关键预防措施是通过疫苗免疫进行防控,鸡 20~30 日龄时刺种 1 次^[40]。ddPCR 方法和 SN/T 法分别对 25 份鸡血液样本进行检测,结果均为阴性。结果表明,该养殖场对禽痘病毒的预防较好,未发生禽痘病毒感染。

4 结 论

本研究建立了一种具有高度可重复性、灵敏性、稳定性和特异性的 FWPV ddPCR 检测方法。其相较于传统 PCR 技术,该检测方法能够对样本中

的FWPV进行定量检测。ddPCR检测方法可以简化操作步骤,提高检测准确率。此外,该检测方法符合对样品中FWPV的定性和定量检测要求。为FWPV的早期精确诊断和其他相似症状疾病提供新的鉴定方法。

参考文献 (References):

- [1] GIOTIS E S, LAIDLAW S M, BIDGOOD S R, et al. Modulation of early host innate immune response by an avipox vaccine virus' lateral body protein[J]. *Biomedicines*, 2020, 8(12):634.
- [2] SONG H S, KIM H S, KIM S H, et al. Research note: simultaneous detection of infectious laryngotracheitis virus, fowlpox virus, and reticuloendotheliosis virus in chicken specimens [J]. *J Poult Sci*, 2021, 100 (4) : 100986.
- [3] 李亮亮, 由玉岩, 任倩俐. 褐马鸡常见疾病的预防与治疗[J]. 畜牧业环境, 2024(13):87-88.
LI L L, YOU Y Y, REN J L. Prevention and treatment of common diseases in crossoptilon mantchuricum[J]. *Animal Industry and Environment*, 2024(13):87-88. (in Chinese)
- [4] 田如玉. 斑鸠源禽痘病毒的分离鉴定及检测方法的初步建立[D]. 武汉:华中农业大学, 2022.
TIAN R Y. Isolation, identification and detection method of avian pox virus from turtledove [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2022. (in Chinese)
- [5] GIOTIS E S, SKINNER M A. Spotlight on avian pathology: fowlpox virus [J]. *Avian Pathol*, 2019, 48 (2):87-90.
- [6] 宋玉红. 禽痘病毒的诊断与防控[J]. 兽医导刊, 2021 (17):32-33.
SONG H Y. Diagnosis and control of fowlpox virus [J]. *Veterinary Orientation*, 2021 (17) : 32-33. (in Chinese)
- [7] YEHIA N, ELSAYED S, AL-SAEED F A, et al. Current situation and genomic characterization of fowlpox virus in lower egypt during 2022[J]. *J Poult Sci*, 2023, 102(8):102769.
- [8] SARMA G, KERSTING B A, SPINA G. Field safety and efficacy of a unique live virus vaccine for controlling avian encephalomyelitis and fowlpox in poultry[J]. *Vet World*, 2019, 12(8):1291-1298.
- [9] VAN DER MEER C S, PAULINO P G, JARDIM T H A, et al. Detection and molecular characterization of Avipoxvirus in Culex spp. (Culicidae) captured in domestic areas in Rio de Janeiro, Brazil[J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1):13496.
- [10] MAPACO L P, LACERDA Z, MONJANE I V A, et al. Molecular characterization of avipoxviruses circulating in Mozambique, 2016-2018[J]. *Arch Virol*, 2018, 163 (8):2245-2251.
- [11] MURER L, WESTENHOFEN M, KOMMERS G D, et al. Identification and phylogenetic analysis of clade C Avipoxvirus in a fowlpox outbreak in exotic psittacines in southern Brazil[J]. *J Vet Diag Investig*, 2018, 30(6):946-950.
- [12] MATOS M, BILIC I, PALMIERI N, et al. Epidemic of cutaneous fowlpox in a naïve population of chickens and turkeys in Austria: detailed phylogenetic analysis indicates co-evolution of fowlpox virus with reticuloendotheliosis virus[J]. *Transbound Emerg Dis*, 2022, 69(5):2913 - 2923.
- [13] TADESE T, FITZGERALD S, REED W M. Detection and differentiation of re-emerging fowlpox virus (FWPV) strains carrying integrated reticuloendotheliosis virus (FWPV-REV) by real-time PCR [J]. *Vet Microbiol*, 2008, 127(1-2):39-49.
- [14] BRANDOLINI M, TADDEI F, MARINO M M, et al. Correlating qRT-PCR, dPCR and viral titration for the identification and quantification of SARS-CoV-2: a new approach for infection management [J]. *Viruses*, 2021, 13(6):1022.
- [15] 杨国平, 周彪, 苏小建, 等. 猴痘病毒数字PCR检测方法的建立[J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2024, 47 (4):340-344.
YANG G P, ZHOU B, SU X J, et al. Establishment of digital PCR method for detection of monkeypox virus [J]. *Chinese Journal of Frontier Health and Quarantine*, 2024, 47(4):340-344. (in Chinese)
- [16] VYNCK M, TRYPSTEEN W, THAS O, et al. The future of digital polymerase chain reaction in virology [J]. *Mol Diagn Ther*, 2016, 20(5):437-447.
- [17] FANG W B, LIU X D, MAIGA M, et al. Digital PCR for single-cell analysis [J]. *Biosensors (Basel)*, 2024, 14(2):64.
- [18] 田国忠, 姜海, 薛盼盼, 等. 布鲁氏菌微滴式数字PCR方法的建立与应用[J]. 中国人兽共患病学报, 2021, 37(4):301-305.

- TIAN G Z, JIANG H, XUE P P, et al. Establishment and application of droplet digital PCR in the detection of Brucella[J]. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2021, 37(4):301-305. (in Chinese)
- [19] 原 霖,董 浩,倪建强,等. 非洲猪瘟病毒微滴数字PCR检测方法的建立[J]. 畜牧与兽医, 2019, 51(7): 81-84.
- YUAN L, DONG H, NING J Q, et al. Development of droplet digital PCR for detection of African swine fever virus [J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2019, 51(7):81-84. (in Chinese)
- [20] 郑子繁,柳方方,刘卫晓,等. 数字PCR技术在核酸标准物质研制中的应用[J]. 生物技术进展, 2020, 10(6):579-584.
- ZHENG Z F, LIU F F, LIU W X, et al. Application of digital PCR technology in the development of nucleic acid reference materials [J]. *Current Biotechnology*, 2020, 10(6):579-584. (in Chinese)
- [21] 冯 杰,裴洪波,曹乾大,等. 微滴式数字PCR技术在动物疫病检测中的应用研究进展[J]. 中国动物检疫, 2024, 41(4):58-63, 90.
- FENG J, NIE H B, CAO Q D, et al. Research progress in the application of droplet-based digital PCR assay to animal disease detection [J]. *China Animal Health Inspection*, 2024, 41(4):58-63, 90. (in Chinese)
- [22] 蒋文明,李金平,尹 馨,等. H7亚型禽流感病毒微滴式数字PCR检测方法的建立及应用[J]. 中国兽医杂志, 2023, 59(2):39-43.
- JIANG W M, LI J P, YIN X, et al. Development and application of droplet digital PCR for detection of H7 subtype avian influenza virus [J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2023, 59(2):39-43. (in Chinese)
- [23] HOPKEN M W, PIAGGIO A J, PABILONIA K L, et al. Predicting whole genome sequencing success for archived avian influenza virus (Orthomyxoviridae) samples using real-time and droplet PCRs[J]. *J Virol Methods*, 2020, 276:113777.
- [24] LI Q C, ZHANG Y B, MENG F F, et al. A New strategy for the detection of chicken infectious anemia virus contamination in attenuated live vaccine by droplet digital PCR[J]. *Bio Med Res Int*, 2019, 2019: 2750472.
- [25] CAO Y Q, YU M, DONG G H, et al. Digital PCR as an emerging tool for monitoring of microbial biodegradation [J]. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 2020, 25(3):706.
- [26] ZHU H L, ZHANG H Q, XU Y, et al. PCR past, present and future [J]. *Biotechniques*, 2020, 69(4): 317-325.
- [27] GRIFFITHS K R, MCLAUGHLIN J L H, HALL F, et al. Development of seven new dPCR animal species assays and a reference material to support quantitative ratio measurements of food and feed products [J]. *Foods (Basel, Switzerland)*, 2023, 12(20):3839.
- [28] QUAN P L, SAUZADE M, BROUZES E. dPCR: a technology review [J]. *Sensors (Basel)*, 2018, 18(4): 1271.
- [29] HINDSON C M, CHEVILLET J R, BRIGGS H A, et al. Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real-time PCR [J]. *Nat Methods*, 2013, 10(10):1003-1005.
- [30] 王艺凯,齐 玮,杨 诣,等. 数字PCR技术在国门生物安全保障领域的应用[J]. 分析仪器, 2023(6): 109-116.
- WANG Y K, QI W, YANG Y, et al. Application of digital PCR technology in the field of entry and exit port biosecurity assurance [J]. *Analytical Instrumentation*, 2023(6):109-116. (in Chinese)
- [31] SHARIF H M. Molecular properties of serum thymidine kinase 1 and use of the canine enzyme in disease monitoring [D]. Uppsala: Swedish University of Agricultural Sciences, 2012.
- [32] DENG L C, LIU C X, LI L T, et al. Genomic characteristics of an avipoxvirus 282E4 strain [J]. *Virus Res*, 2023, 336:199218.
- [33] 国家质量监督检验检疫总局. 禽痘检疫技术规范: SN/T 1226-2015[S]. 北京:中国标准出版社, 2015.
- General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine. Quarantine protocol for fowlpox: SN/T 1226-2015[S]. Beijing: Standards Press of China, 2015. (in Chinese)
- [34] 罗海峰,杜红心,彭必江,等. 基层医院生化分析仪的使用现状与需求调查[J]. 检验医学与临床, 2015, 12(16):2309-2310, 2430.
- LUO H F, DU H X, PENG B J, et al. Investigation and analysis on current situation and demands of biochemical analyzers in primary hospitals [J]. *Laboratory Medicine and Clinic*, 2015, 12(16):2309-2310, 2430. (in Chinese)

- [35] 史光霞. 基层检验的现状和改进建议[J]. 检验医学与临床, 2007(1):62-63.
- SHI G X. The Current Status and Improvement Proposals for Grassroots Inspection [J]. *Laboratory Medicine and Clinic*, 2007 (1):62-63. (in Chinese)
- [36] 郭 婷, 王 磊, 李小飞. 非小细胞肺癌 EGFR 突变检测技术的研究进展[J]. 临床与病理杂志, 2017, 37(9):1936-1942.
- GUO T, WANG L, LI X F. Research progress in the detection technology of EGFR mutations in non-small cell lung cancer[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2017, 37(9):1936-1942. (in Chinese)
- [37] SHI J Z, JIN Q Y, ZHANG X Z, et al. The development of a sensitive droplet digital polymerase chain reaction test for quantitative detection of goose astrovirus[J]. *Viruses*, 2024, 16(5):765.
- [38] 秦 爱, 王 娟, 邓方进, 等. 数字聚合酶链式反应技术在食品安全核酸检测领域中的研究进展及标准化现状[J]. 食品科学, 2024, 45(18):350-360.
- QIN A, WANG J, DENG F J, et al. Progress in the application of digital polymerase chain reaction in food safety detection and current status of its standardization [J]. *Food Science*, 2024, 45(18):350-360. (in Chinese)
- [39] 张新建, 马向红, 陈 威. 禽痘的流行诊断和防控[J]. 饲料博览, 2020(5):69.
- ZHANG X J, MA X H, CHEN W. Epidemiology, diagnosis and prevention of avian pox [J]. *Feed Review*, 2020(5):69. (in Chinese)
- [40] 王鉴波. 禽痘的流行和诊治[J]. 现代畜牧科技, 2016(4):109.
- WANG J B. The prevalence and diagnosis of fowlpox [J]. *Modern Animal Husbandry Science & Technology*, 2016(4):109. (in Chinese)
- (编辑 白永平)