

沈海潇, 李鑫, 杨德全, 等. 犬 C 群轮状病毒探针法实时荧光 RT-LAMP 方法的建立与应用 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (2): 97-104.

SHEN H X, LI X, YANG D Q, et al. Establishment and application of probe-based real-time RT-LAMP method for detecting canine rotavirus C Establishment and application of probe-based real-time RT-LAMP method for detecting canine rotavirus C [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (2): 97-104.

犬 C 群轮状病毒探针法实时荧光 RT-LAMP 方法的建立与应用

沈海潇^{1,2}, 李鑫², 杨德全², 葛菲菲², 王建², 黄士新^{2*}, 姜平^{1*}

(1. 南京农业大学动物医学院/农业农村部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室, 江苏 南京 210095;

2. 上海市动物疫病预防控制中心, 上海 201400)

摘要: 旨在建立一种检测犬 C 群轮状病毒 (CRV C) 的探针法实时荧光反转录环介导等温扩增方法 (RT-LAMP)。以病毒基因组的保守序列 VP6 为靶标, 设计合成 1 组 LAMP 引物探针, 对反应的各项参数进行优化后确定方法的特异性、敏感性等各项指标, 进行临床样品检测以评估方法的实际效果。结果: 该方法检测下限为 7.71×10^0 copies/ μ L, 敏感性与荧光定量 RT-PCR 相当。重复试验结果的变异系数小于 4.35%。与犬 A 群轮状病毒 (CRV A)、犬瘟热病毒 (CDV)、犬细小病毒 (CPV)、犬肠道冠状病毒 (CCoV) 和犬星状病毒 (CaAstV) 均无交叉反应。临床样品检测符合率试验表明, 本方法与荧光定量 RT-PCR 方法的总体符合率达到了 98.46% (64/65)。综上, 本研究建立的探针法实时荧光 RT-LAMP 方法具有反应快速、灵敏度高、特异性强、仪器成本低等优点, 可用于 CRV C 快速检测、临床诊断与疫病监测。

关键词: 探针法; 环介导等温扩增; 犬 C 群轮状病毒; 快速检测

中图分类号: S852.65 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2025)02-0097-08

Establishment and application of probe-based real-time RT-LAMP method for detecting canine rotavirus C

SHEN Haixiao^{1,2}, LI Xin², YANG Dequan², GE Feifei², WANG Jian², HUANG Shixin^{2*}, JIANG Ping^{1*}

(1. College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University/Key Laboratory of Animal Diseases

Diagnosis and Immunology, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Nanjing 210095, China;

2. Shanghai Animal Disease Control Center, Shanghai 201400, China)

Abstract: In this study, a probe-based real-time reverse transcription loop mediated isothermal amplification (RT-LAMP) method was established for detecting canine rotavirus C (CRV C). Targeting the conserved sequence VP6 of the rotavirus genome, a set of LAMP primers and a set of probes were designed and synthesized, and various reaction parameters were optimized to determine the sensitivity, specificity and other performances of the method. Finally, the method was compared with the qRT-PCR and dye-based real-time RT-LAMP methods, and clinical samples were detected to evaluate the practical effects of the method. The results showed that the detection limit of the method was 7.71×10^0 copies/ μ L, which was similar to that of fluorescence quantitative RT-PCR. And it had no cross-reactivity with canine rotavirus A (CRV A), canine distemper virus (CDV), canine parvovirus (CPV), canine coronavirus (CCoV), or canine astrovirus (CaAstV). Its coefficient of variation for repeated testing was less than 5%. The clinical sample testing results showed that the present method had a total concordance rate of 98.64% (64/65), compared with fluorescence quantitative RT-PCR. In summary, this method possessed the advantages of being rapid, highly sensitive, highly specific, and of low instrument cost, making it appropriate for rapid detection and clinical diagnosis of canine CRV C.

Keywords: probe-based; LAMP; CRV C; rapid diagnosis

收稿日期: 2024-03-19; 修回日期: 2024-12-18

基金项目: 上海市科技兴农项目 (2022-02-08-00-12-F01122)

第一作者: 沈海潇, 男, 博士研究生

* 通信作者: 姜平, 教授, 主要从事动物传染病学的工作与研究工作, E-mail: jiangp@njau.edu.cn; 黄士新, 推广研究员, 主要从事兽药残留分析和安全评价与动物疫病防控, E-mail: huangshx1968@sina.cn.

犬轮状病毒 (CRV) 属于呼肠孤病毒科轮状病毒属, 病毒基因组为分节段双链 RNA, 分别编码 6 种结构蛋白 (VP1~4、VP6、VP7) 和 5~6 种非结构蛋白 (NSP1~NSP5/6)^[1]。VP6 在 CRV 中结构最为保守, 根据其抗原性可将 CRV 分为 9 个血清型 (A~I 型)。临床上幼犬最易感染 CRV, 表现为隐性感染或者不同程度的腹泻、呕吐以及脱水, 严重脱水时还会引起心血管衰竭以及其他疾病的继发感染^[2-3]。轮状病毒 (RV) 的跨种属传播情况十分普遍。曾有研究发现, 人轮状病毒 (HRV) 与犬/猫 A 群轮状病毒 (CRV A/FRV A) 的基因重配^[4], 因此针对 CRV A 的检测受到了广泛的重视^[5-6]。相对而言, 犬 C 群轮状病毒 (CRV C) 相关的研究材料较少。CRV C 于 20 世纪 90 年代首次被发现^[7], 临床上各年龄段的犬都易感, 且通常与其他肠道病毒混合感染^[8-10]。现有的研究表明, CRV C 也可能通过基因重配而发生跨物种传播^[11-12]。因此, CRV C 不仅威胁犬的健康, 还威胁着人类以及其他物种的安全, 针对 CRV C 的监测十分具有公共卫生意义。

随着分子诊断技术的发展, 包括聚合酶链式反应 (PCR)^[13]、环介导等温扩增 (LAMP)^[14] 和重组酶聚合酶扩增 (RPA)^[15] 等在内的分子诊断技术已经愈发成熟。近年来, 由于 LAMP 方法有着反应时间短、成本低、特异性高等优势, 在即时检测领域得到了从业者的广泛认可^[16], 也衍生出了多种基于 LAMP 的检测方法^[17]。探针法实时荧光 LAMP 就是由此发展出的方法之一, 该方法比普通 LAMP 更敏感, 比染料法实时荧光 LAMP 更特异, 已经应用于多个重要疫病的检测^[18-19]。

鉴于目前缺乏针对 CRV C 快速、准确的检测方法, 导致该病毒临床监测不足以及流行病学资料缺失, 无法进一步评估其潜在的公共卫生隐患。为提高该病的检测效率, 本研究建立了一种基于荧光共振能量转移 (FRET) 原理的探针法实时荧光 RT-LAMP, 为 CRV C 提供一种高效、特异的检测手段。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

Bst II Pro DNA Polymerase Large Fragment、10× Isothermal Amplification Buffer、HiScript II Reverse Transcriptase、dNTPs Mix、MgSO₄ 购自南京诺唯赞生物技术有限公司; 病毒核酸提取试剂盒购自 Magen Biotech; Ribo MAX™ Large Scale RNA Product Systems 体外转录试剂盒购自美国 Promega 公司; CRV C VP6 质粒 (pET32a-VP6) 购自生工生物工程

(上海) 股份有限公司; One Step PrimeScript™ RT-PCR Kit (Perfect Real Time) 购自 TaKaRa 公司。

1.2 临床样本来源

2023 年 1 月至 2023 年 10 月, 于上海市内各家宠物医院和犬类留验所收集到临床上表现为腹泻症状病犬的肛门棉拭子粪便样品共 65 份, 其中 47 份样品来自宠物医院, 18 份样品来自犬类留验所。采集的样本放入含 PBS 的离心管中震荡混匀后, -80 °C 保存备用。本研究中所使用的犬肠道病毒核酸均来自于临床上的阳性样品, 由本实验室收集并保存。

1.3 核酸提取与模板制备

核酸提取: 使用 MAGEN 病毒核酸提取试剂盒提取样品核酸。

阳性模版制备: 针对 CRV C VP6 基因设计 PCR 引物, 在引物的 5' 端额外插入 T7 启动子序列。以阳性质粒为模版进行 PCR 扩增得到目的片段后, 使用 Ribo MAX™ Large Scale RNA Product Systems 体外转录试剂盒将胶回收产物转录为 ssRNA。测量产物浓度并根据公式: 拷贝数 = $6.02 \times 10^{23} \times \text{ssRNA 浓度} \times 10^{-9} / (340 \times \text{ssRNA 碱基数})$, 换算成 ssRNA 拷贝数, 产物于 -80 °C 保存备用。

1.4 LAMP 引物的设计

根据筛选到的 CRV C 保守基因 VP6 (GenBank 登录号: KP988017) 设计引物。常规 LAMP 引物集使用 Primer Explorer V5.0 在线软件进行设计。荧光探针的 F 链和 Q 链使用 Mfold 分析软件和 OligoAnalyzer 3.1 软件设计成产生最小二次结构的序列, 并保证其退火温度在 75 °C 以上。引物序列见表 1, 位置信息见图 1。上述引物探针由上海赛恒生物科技有限公司合成。

1.5 探针法实时荧光 RT-LAMP 反应条件的优化

以阳性质粒作为模板, 选择 LAMP 反应过程中最重要的 6 个参数进行优化, 分别是: 反应温度 (63、64、65 和 66 °C), MgSO₄ 浓度 (4、6、8 和 10 mmol/L), *Bst* II 酶浓度 (0.16、0.32、0.48 和 0.64 U/μL), dNTP 浓度 (1、1.4、1.8 和 2.2 mmol/L), 探针 Q 链 (μmol/L) 与 F 链 (μmol/L) 的比例 (0.08 : 0.04、0.08 : 0.08、0.12 : 0.08 和 0.16 : 0.08) 以及反转录酶的浓度 (0.2、0.3、0.4 和 0.5 U/μL)。反转录酶的最佳浓度以阳性质粒转录的 ssRNA 为模版测定。反应时间为 60 min, 每 60 s 收集一次荧光信号, 最终加热至 90 °C 终止反应。试验根据产生荧光信号的反应时间 (*T_p*) 来确定最佳的反应条件。

表 1 引物与探针

种类	名称	序列 (5'→3')
RT-LAMP 引物	F3	GTCAGCTGGTTGATATGATCAGAA
	B3	TGTGAATCGCATAATACAGACTCTG
	FIP-FIC	TGAGTCATGGCAGCTGGTCTAATCA
	FIC-F2	GGGGTGGCAACAGTGAGA
	BIP-FIC	CGTACAGCAACTGTTTCTCAGGG
	BIP+ B2	TGTGGCATCTAATACACTGAGTG
	LB	GTCCATACTCTCATCAGGCTGCTT
RT-LAMP 荧光探针	F 链	FAM-AATACAGCACTCTCACGCCGAAT <u>GTCCATACTCTCATCAGGCTGCTT</u>
	Q 链	ATTCCGGCGTGAGAGTGCTGTATT-BHQ1
荧光定量 RT-PCR	上游引物	GTTGCATCCGTGAAGAGAATG
	下游引物	AGCCACATAGTTCACATTTTCATCC
	TaqMan 探针	FAM-ACCATGTAGCATGATTCACGAATGGGT-BHQ1

注：下划线部分是 F 链中与 Q 链互补的序列。

CRV C 的 VP6 序列：

800 GTCAGCTGGTTGATATGATCAGAAATATGGGGTGGCAACAGTGAGAACTTTTGACTCTT 859
F3 F2

860 ATAGAATTACGATTGATATGATTAGACCAGCTGCCATGACTCAGTACGTACAGCAACTGT 919
F1 B1

920 TTCCTCAGGGTGGTCCATATCTCATCAGGCTGCTTATATGCTTACTCAGTGATTAG 979
LF/F链 B2

980 ATGCCACAACAGAGTCTGTATTATGCGATTACA 1 012
B3

图 1 CRV C 的 VP6 序列引物探针位置

1.6 敏感性试验

将由质粒转录的 ssRNA 梯度稀释为 $7.71 \times 10^4 \sim 7.71 \times 10^{-1}$ copies/μL 作为模板进行敏感性试验，确定该方法的检测下限。

1.7 特异性试验

以 CRV C、CRV A、犬瘟热病毒 (CDV)、犬细小病毒 (CPV)、犬冠状病毒 (CCoV) 和犬星状病毒 (CaAstV) 核酸为模板，以 ddH₂O 为阴性对照，评估探针法实时荧光 RT-LAMP 检测方法的特异性。CPV LAMP 反应体系中不需要加入反转录酶，其他条件不变。

1.8 重复性试验

以不同浓度的 ssRNA 为模板，每个浓度用探针法实时荧光 RT-LAMP 重复检测 3 次。根据其 *T_p* 值计算变异系数，评价该方法的重复性。

1.9 探针法实时荧光 RT-LAMP 反应效率评估

以不同浓度的 ssRNA 为模板，分别应用探针法实时荧光 RT-LAMP 与染料法实时荧光 RT-LAMP、荧光定量 RT-PCR 进行核酸扩增。通过比较与另外两种方法在检测下限和扩增效率的差异来评估探针法实时荧光 RT-LAMP 的反应效率。

染料法实时荧光 RT-LAMP 的反应体系是将 Q 链和 F 链去除，然后加入 0.5 μL 的 50×SYBR GREEN 染料，其余反应条件不变。

1.10 CRV C 荧光定量 RT-PCR 方法

用本实验室先前建立的荧光定量 RT-PCR 方法进行临床样品的 CRV C 检测。荧光定量 RT-PCR 方法的引物探针见表 1。反应体系为 25 μL，其中 2×One-step RT-PCR Bufer 12.5 μL，*Ex Taq* HS 1 μL，PrimeScript RT Enzyme Mix 1 μL，上下游引物 0.2

$\mu\text{mol/L}$, TaqMan 探针 $0.1 \mu\text{mol/L}$, 核酸 $5 \mu\text{L}$ 以及适量的 ddH_2O 。反应程序: $42 \text{ }^\circ\text{C}$ 反转录 20 min ; $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 10 min ; $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 15 s , $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 退火 35 s , 40 个循环。

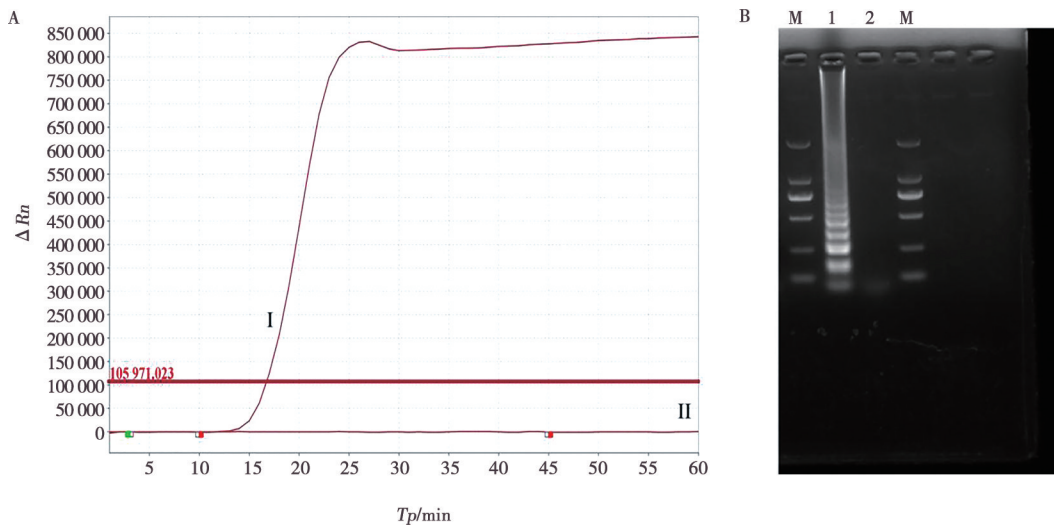
1.11 临床样品检测与符合率比较

将 65 份临床犬肛拭子样品分别使用荧光定量 RT-PCR 和探针法实时荧光 RT-LAMP 进行 CRV C 检测, 计算二者的阳性符合率、阴性符合率和整体符合率。

2 结果

2.1 LAMP 引物探针有效性验证

通过比较 NCBI GenBank 中 CRV C VP6 基因的保守区域, 使用 Primer Explorer 5 在线软件进行引物设计, 使用 Mfold 和 OligoAnalyzer 3.1 软件设计 1 对荧光探针, 最后对引物探针进行了有效性验证。结果如图 2 所示, 使用的引物探针以阳性质粒为模版进行 LAMP 反应能够产生荧光信号, 电泳结果表明扩增产物产生了 LAMP 反应典型的梯状条带, 说明该引物探针是可靠有效的。



I. 阳性质粒; II. 阴性对照; M. DL2000 DNA Marker; 1. 阳性质粒; 2. 阴性对照。

图 2 引物探针有效性 (A) 和 2% SDS-PAGE (B) 验证结果

2.2 探针法实时荧光 RT-LAMP 反应条件的优化

为了实现探针法实时荧光 RT-LAMP 扩增效率最大化, 对反应的 6 个重要参数进行了优化。结果如图 3 所示, 当 dNTP 浓度为 1.8 mmol/L , MgSO_4 浓度为 8 mmol/L , $Bst \text{ II}$ 酶浓度为 $0.48 \text{ U}/\mu\text{L}$, 同化探针 Q 链浓度为 $0.16 \mu\text{mol/L}$, F 链浓度为 $0.08 \mu\text{mol/L}$, 逆转录酶浓度为 $0.3 \text{ U}/\mu\text{L}$, 反应温度为 $65 \text{ }^\circ\text{C}$ 时, T_p 值最低。因此, 探针法实时荧光 RT-LAMP 的最佳反应体系: $10\times$ Isothermal Amplification Buffer $2.5 \mu\text{L}$, $Bst \text{ II Pro DNA 聚合酶 } 0.48 \text{ U}/\mu\text{L}$, HiScript II Reverse Transcriptase $0.3 \text{ U}/\mu\text{L}$, FIP/BIP $1.6 \mu\text{mol/L}$, F3/B3 $0.2 \mu\text{mol/L}$, LF $0.8 \mu\text{mol/L}$, Q 链 $0.16 \mu\text{mol/L}$, F 链 $0.08 \mu\text{mol/L}$, dNTP 1.8 mmol/L , MgSO_4 8 mmol/L , 核酸 $5 \mu\text{L}$, 最后加入 ddH_2O 补足

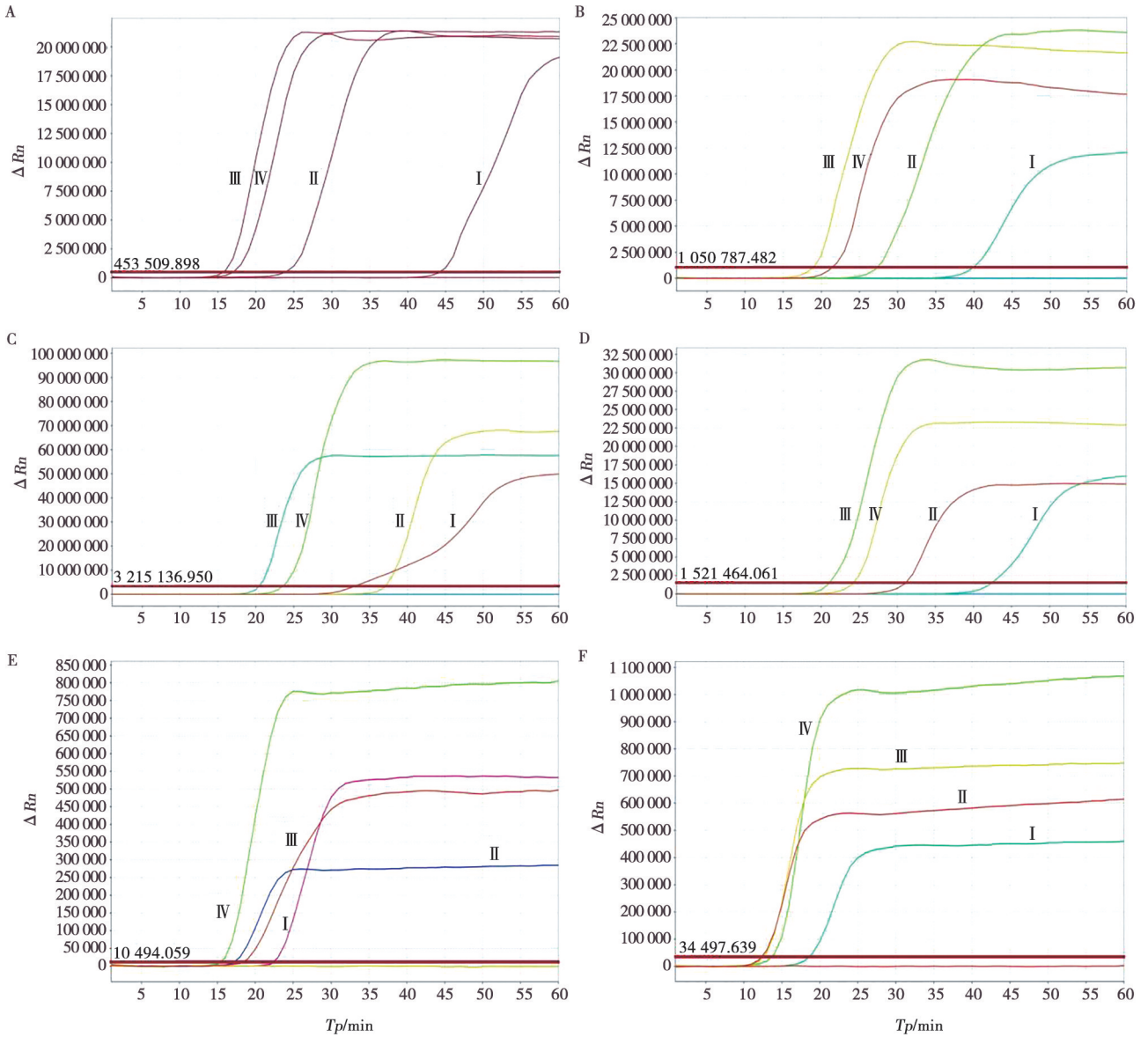
至 $25 \mu\text{L}$ 。反应在 $65 \text{ }^\circ\text{C}$ 下进行 60 min , 每 60 s 收集一次荧光信号, 最终加热至 $90 \text{ }^\circ\text{C}$ 终止反应。

2.3 特异性试验

以 CRV C、CRV A、CDV、CPV、CCoV 和 CaAstV 核酸为模版进行检测。结果如图 4 所示, 只有 CRV C 的阳性核酸能够产生 S 型曲线的荧光信号, 而阴性对照及其他病毒的检测结果为阴性, 说明建立的探针法实时荧光 RT-LAMP 与其他犬肠道病毒无交叉反应。

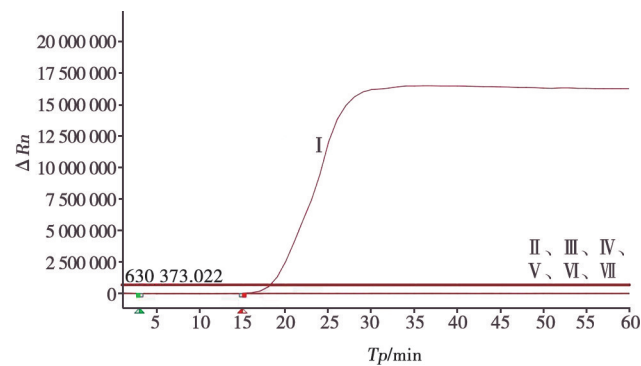
2.4 敏感性试验

以梯度稀释的 ssRNA 为模板进行敏感性试验。结果如图 5 所示, 该方法的最低检测限可达 $7.71 \times 10^0 \text{ copies}/\mu\text{L}$ 。



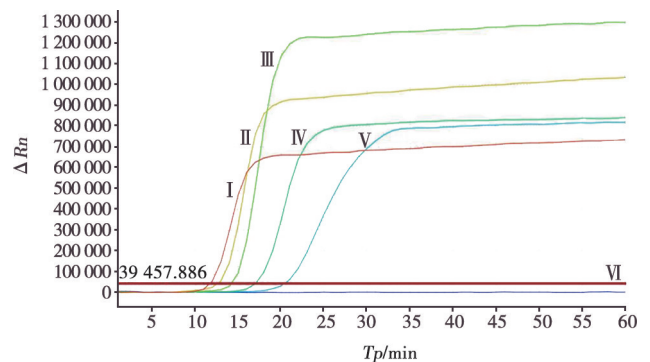
A. 不同反应温度的扩增：I~IV分别为63、64、65和66℃；B. 不同MgSO₄浓度的扩增：I~IV分别为4、6、8和10 mmol/L；C. 不同Bst II酶浓度的扩增：I~IV分别为0.16、0.32、0.48和0.64 U/μL；D. 不同dNTP浓度的扩增：I~IV分别为1、1.4、1.8和2.2 mmol/L；E. 不同Q链(μmol/L)与F链(μmol/L)比例的扩增：I~IV分别为0.08:0.04、0.08:0.08、0.12:0.08和0.16:0.08；F. 不同反转录酶浓度的扩增：I~IV分别为0.2、0.3、0.4和0.5 U/μL。

图3 探针法实时荧光RT-LAMP反应条件优化



I. CRV C; II. CDV; III. CPV; IV. CCoV; V. CaAstV; VI. CRV A; VII. ddH₂O。

图4 探针法实时荧光RT-LAMP特异性试验



I~VI. $7.71 \times 10^4 \sim 7.71 \times 10^{-1}$ copies/μL, 依次10倍梯度稀释。

图5 探针法实时荧光RT-LAMP敏感性试验

2.5 重复性试验

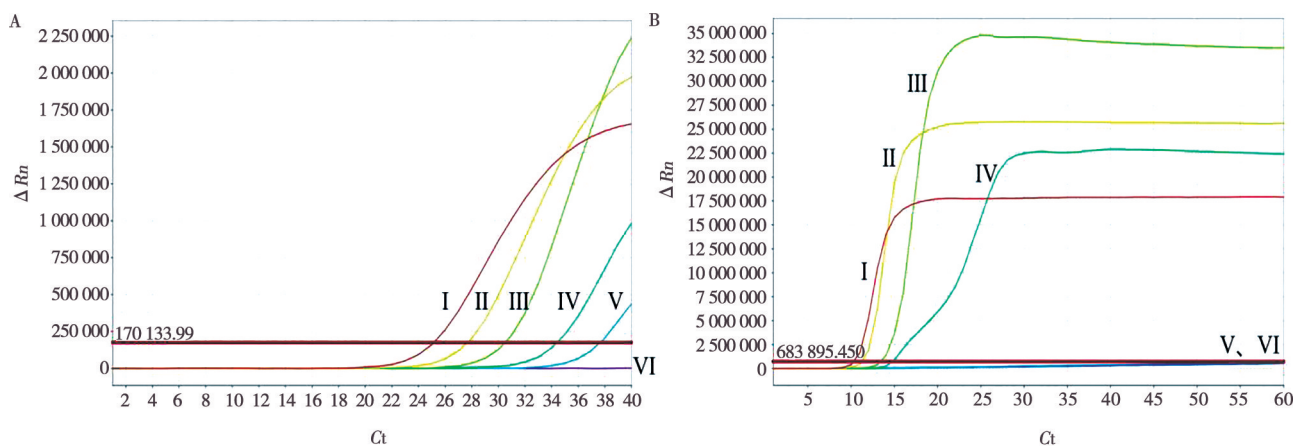
以梯度稀释的 ssRNA 为模板进行方法的重复性试验, 每个稀释度重复检测 3 次。结果如表 2 所示, 组内变异系数均小于 4.35%。

表 2 探针法实时荧光 RT-LAMP 重复性试验

质粒浓度/ (copies · μL ⁻¹)	Tp/min			变异系数/%
	第 1 次	第 2 次	第 3 次	
7.71×10 ⁴	10.11	10.08	10.04	0.34
7.71×10 ³	11.20	11.12	11.07	0.59
7.71×10 ²	14.40	14.28	14.51	0.80
7.71×10 ¹	15.06	15.61	15.74	2.33
7.71×10 ⁰	19.31	20.51	21.03	4.35

2.6 探针法实时荧光 RT-LAMP 方法反应效率评估

分别比较探针法实时荧光 RT-LAMP 与染料法实时荧光 RT-LAMP 和荧光定量 RT-PCR 的扩增效率和检测下限。探针法实时荧光 RT-LAMP (图 5) 和荧光定量 RT-PCR (图 6A) 的检测下限均可以达到 7.71×10⁰ copies/μL, 而染料法实时荧光 RT-LAMP (图 6B) 的检测下限为 7.71×10¹ copies/μL。反应时间上, 探针法实时荧光 RT-LAMP 检测 7.71×10⁴ copies/μL 和 7.71×10⁰ copies/μL 的阳性模版需要的时间分别为 11.23 min 和 20.02 min, 而荧光定量 RT-PCR 则需要 40.92 min (Ct 值为 25.10) 和 51.52 min (Ct 值为 37.82)。



I ~ VI. 7.71×10⁴ ~ 7.71×10⁻¹ copies/μL。

图 6 荧光定量 RT-PCR (A) 与染料法实时荧光 RT-LAMP (B) 扩增效率试验

2.7 临床样品检测与符合率评估

分别使用荧光定量 RT-PCR 和探针法实时荧光 RT-LAMP 对 65 份临床犬肛拭子样品进行 CRV C 检测。结果如表 3 所示, 使用荧光定量 RT-PCR 方法共检出 6 份阳性样品, 阳性率为 9.23%; 使用探针法实时荧光 RT-LAMP 共检出 5 份阳性样品, 阳性率为 7.69%。反应效率上, 使用荧光定量 RT-PCR 检测阳性样品的平均 Ct 值为 31.52±4.68, 对应平均检测时间为 (46.23±3.90) min; 而使用探针法实时荧光 RT-LAMP 检测阳性样本的平均检测时间为 (20.13±2.31) min。对方法的符合率进行评估, 结果如表 4 所示, 两种方法的阳性符合率为 83.33% (5/6), 阴性符合率为 100% (59/59), 整体符合率为 98.46% (64/65), 仅 1 份样品结果不符合。

表 3 探针法实时荧光 RT-LAMP 临床样品检测 (n=65)

方法	阳性率/%	阴性率/%
荧光定量 RT-PCR	9.23	90.77
探针法实时荧光 RT-LAMP	7.69	92.31

表 4 检测符合率评价

探针法实时荧光 RT-LAMP	荧光定量 RT-PCR		
	阳性数/份	阴性数/份	总计/份
阳性数/份	5	0	5
阴性数/份	1	59	60
总计/份	6	59	65

3 讨论

Bst 酶是一种具有链置换活性的 DNA 聚合酶, 是实现环介导等温扩增的核心, 但由于 Bst 酶缺少 5'→

3'核酸外切酶活性^[20], TaqMan 探针无法应用其中, 因此 LAMP 的实时荧光检测通常是通过添加荧光染料实现的。由于荧光染料属于非特异性荧光标记, 加之 LAMP 扩增中存在多个引物, 因此在反应过程中由于错配而导致假阳性时有发生^[21-23]。为了解决这一问题, Kubota 等^[24]发明了一种基于 FRET 原理的探针 (同化探针) 用于 LAMP 方法。该方法的原理是, 反应开始前, 同化探针的 F 链和 Q 链互补结合导致 5'端的荧光信号被 3'端的猝灭基团吸收; 随着 LAMP 反应的开始, 含猝灭基团的 Q 链会随着 DNA 链的延伸被置换出来, F 链的荧光基团发出荧光信号。该方法在保留 LAMP 高效扩增优点的同时, 进一步提高了 LAMP 方法的敏感性与特异性^[25-26]。

本研究参考了 Kubota 等^[24]所发表的方法原理, 设计并完成了 CRV C 探针法实时荧光 RT-LAMP 的优化和临床验证。为获得最佳的扩增效果, 本研究针对反应参数进行了一系列的优化, 最终确定了最佳反应体系。值得注意的是, 在不同 RT-LAMP 方法的研究中, 逆转录酶的使用浓度差异较大^[27-28]。本研究发现, 在 RT-LAMP 反应中, 逆转录酶浓度过高或过低都会对 LAMP 扩增效率产生一定的影响。

本研究使用质粒转录的 ssRNA 作为阳性模板进行方法的特异性、敏感性和重复性试验。特异性试验表明本方法与其他常见的肠道病毒无交叉反应, 特异性较高。敏感性试验结果显示, 方法检测下限为 7.71×10^0 copies/ μL , 与荧光定量 RT-PCR 相当。重复试验结果的变异系数小于 4.35%, 说明方法重复性较好。在反应效率方面, 探针法比染料法实时荧光 RT-LAMP 更敏感, 比荧光定量 RT-PCR 检测用时更短。

本研究采用探针法实时荧光 RT-LAMP 和荧光定量 RT-PCR 同时检测 65 份临床样品并计算方法的符合率。荧光定量 RT-PCR 方法由本实验室先前构建, 检测下限为 7.71×10^0 copies/ μL , 具有临床诊断意义。试验结果表明, 两种方法的阳性符合率为 83.33% (5/6), 阴性符合率为 100% (59/59), 整体符合率为 98.46% (64/65), 仅有 1 份荧光定量 RT-PCR 阳性样品结果不符合 (该样品来自犬类留验所, 应用本研究建立的 LAMP 方法无法检出)。导致结果不一致的原因尚不清楚, 可能是由于两种方法本身的差异性导致, 也可能是样品中存在未知抑制剂所引起。检测用时方面, 探针法实时荧光 RT-LAMP 的平均阳性检出时间为 20.13 min, 大大低于荧光定量 RT-PCR 的 46.23 min。因此, 该方法将更适用于临床上 CRV C 的快速鉴别诊断。

综上所述, 本研究建立的 CRV C 探针法实时荧

光 RT-LAMP 检测方法敏感性高, 特异性好, 反应时间短, 可用于该病毒快速检测、临床诊断与疫病监测。

参考文献:

- [1] MIHALOV-KOVACS E, GELLERT A, MARTON S, et al. Candidate new rotavirus species in sheltered dogs, Hungary [J]. *Emerg Infect Dis*, 2015, 21 (4): 660-663.
- [2] 姜智礼. 犬轮状病毒病的诊治 [J]. *中国畜牧兽医文摘*, 2016, 32 (10): 200.
- [3] 李文钢, 郝宝娟, 王虹, 等. 幼犬轮状病毒性腹泻的诊治 [J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2015 (2): 87-88.
- [4] WANG Y, PANG B, ZHOU X, et al. Complex evolutionary patterns of two rare human G3P [9] rotavirus strains possessing a feline/canine-like H6 genotype on an AU-1-like genotype constellation [J]. *Infect Genet Evol*, 2013, 16: 103-112.
- [5] 陈月. 犬轮状病毒多重荧光定量 RT-PCR 方法的建立及其分离鉴定 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2022.
- [6] ELSCHNER M, PRUDLO J, HOTZEL H, et al. Nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction for the detection of group A rotaviruses [J]. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, 2002, 49 (2): 77-81.
- [7] OTTO P, SCHULZE P, HERBST W. Demonstration of group C rotaviruses in fecal samples of diarrheic dogs in Germany [J]. *Arch Virol*, 1999, 144 (12): 2467-2473.
- [8] DUIJVESTIJN M, MUGHINI-GRAS L, SCHURMAN N, et al. Enteropathogen infections in canine puppies: (co-) occurrence, clinical relevance and risk factors [J]. *Vet Microbiol*, 2016, 195: 115-122.
- [9] ALVES C, GRANADOS O, BUDASZEWSKI R, et al. Identification of enteric viruses circulating in a dog population with low vaccine coverage [J]. *Braz J Microbiol*, 2018, 49 (4): 790-794.
- [10] ORTEGA A, MARTINEZ J, BAUTISTA L, et al. Identification of co-infection by rotavirus and parvovirus in dogs with gastroenteritis in Mexico [J]. *Braz J Microbiol*, 2017, 48 (4): 769-773.
- [11] JOSHI M, WALIMBE A, ARYA S, et al. Evolutionary analysis of all eleven genes of species C rotaviruses circulating in humans and domestic animals [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2023, 186: 107854.
- [12] MARTON S, MIHALOV E, DORO R, et al. Canine rotavirus C strain detected in Hungary shows marked genotype diversity [J]. *J Gen Virol*, 2015, 96 (10): 3059-3071.
- [13] 李波, 蒋慧娟, 杨瑾, 等. 荧光定量 PCR 检测技术在动物检疫中的应用进展 [J]. *食品安全导刊*, 2021 (26): 152-154.
- [14] 王欢, 史梅梅, 吴丰春, 等. LAMP-微流控芯片技术在现场检测中的研究进展 [J]. *中国口岸科学技术*, 2022, 4 (4): 43-47.
- [15] 张蕾, 陈亮, 江波涛, 等. 重组酶聚合酶扩增技术在动物病原菌检测中的应用进展 [J]. *动物医学进展*, 2024, 45 (1): 89-94.
- [16] SOROKA M, WASOWICZ B, RYMASZEWSKA A. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): the better sibling of pcr? [J]. *Cells*, 2021, 10 (8): 1931.

- [17] YIGCI D, ATÇEKEN N, YETISEN A K, et al. Loop-mediated isothermal amplification-integrated CRISPR methods for infectious disease diagnosis at point of care [J]. *ACS Omega*, 2023, 8 (46): 43357-43373.
- [18] LIM D, KIM H, CHAE H, et al. Probe-based real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RRT-LAMP) assay for rapid and specific detection of foot-and-mouth disease virus [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2020, 67 (6): 2936-2945.
- [19] KIM H, KIM J, BAEK J, et al. An advanced multiplex real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and reliable detection of porcine epidemic diarrhea virus and porcine internal positive control [J]. *Viruses*, 2023, 15 (11): 2204.
- [20] NOTOMI T, OKAYAMA H, MASUBUCHI H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28 (12): 63.
- [21] KIM S, LEE S, KIM U, et al. Diverse methods of reducing and confirming false-positive results of loop-mediated isothermal amplification assays: a review [J]. *Anal Chim Acta*, 2023, 1280: 341693.
- [22] SCHNEIDER L, BLAKELY H, TRIPATHI A. Mathematical model to reduce loop mediated isothermal amplification (LAMP) false-positive diagnosis [J]. *Electrophoresis*, 2019, 40 (20): 2706-2717.
- [23] GAO X, SUN B, GUAN Y. Pullulan reduces the non-specific amplification of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2019, 411 (6): 1211-1218.
- [24] KUBOTA R, ALVAREZ A, SU W, et al. FRET-based assimilating probe for sequence-specific real-time monitoring of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) [J]. *Biol Eng Trans*, 2011, 4 (2): 81-100.
- [25] LIM D, KIM H, CHAE H, et al. Probe-based real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RRT-LAMP) assay for rapid and specific detection of foot-and-mouth disease virus [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2020, 67 (6): 2936-2945.
- [26] KUBOTA R, JENKINS D. Real-time duplex applications of loop-mediated amplification (LAMP) by assimilating probes [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16 (3): 4786-4799.
- [27] DUKES J, KING D, ALEXANDERSEN S. Novel reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of foot-and-mouth disease virus [J]. *Arch Virol*, 2006, 151 (6): 1093.
- [28] SANO S, FUKUSHI S, YAMADA S, et al. Development of an RT-LAMP assay for the rapid detection of SFTS virus [J]. *Viruses*, 2021, 13 (4): 693.