

艾伟昌, 刘艳美, 陈振辉. 鸭坦布苏病毒、基因 C 型鸭甲肝病毒、鸭圆环病毒一步法多重 PCR 鉴别检测方法的建立及应用 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (2): 118-123.

AI W C, LIU Y M, CHEN Z H. Establishment and application of a one-step multiplex PCR identification and detection method for ducktambous virus, genotype C duck hepatitis A virus, and duck circovirus [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (2): 118-123.

鸭坦布苏病毒、基因 C 型鸭甲肝病毒、鸭圆环病毒 一步法多重 PCR 鉴别检测方法的建立及应用

艾伟昌¹, 刘艳美², 陈振辉^{1*}

(1. 河南省野生动物保护中心, 河南 郑州 450044;

2. 河南农业职业学院, 河南 郑州 451450)

摘要: 旨在建立一种快速鉴别检测鸭坦布苏病毒 (DTMUV)、基因 C 型鸭甲肝病毒 (DHAV-C)、鸭圆环病毒 (DuCV) 的多重 PCR 方法。参考 GenBank 中 DTMUV E 基因序列、DHAV-C VP1 基因序列、DuCV Cap 基因序列分别设计特异性检测引物, 建立鉴别检测 DTMUV、DHAV-C、DuCV 的一步法多重 PCR。该方法对 DTMUV、DHAV-C、DuCV 分别扩增出 720、480 和 250 bp 片段, 对基因 A 型鸭甲肝病毒 (DHAV-A)、新城疫病毒 (NDV)、H9 亚型禽流感病毒 (AIV-H9)、鸭瘟病毒 (DEV)、鸭细小病毒 (DPV)、鸭呼肠孤病毒 (MDRV) 均无扩增产物; 对 DTMUV、DHAV-C、DuCV 最低检测限度分别为 3.8×10^{-5} 、 5.4×10^{-5} 和 6.2×10^{-5} $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; 与 DTMUV、DHAV-C、DuCV 单项 PCR 方法的符合率均为 100%; 该方法检测 290 份临床病料样品, DTMUV 阳性率为 8.97%, DHAV-C 阳性率为 10.69%, DuCV 阳性率为 2.07%, DTMUV/DuCV 混合感染阳性率为 4.14%, DHAV-C/DuCV 混合感染阳性率为 3.10%, DTMUV/DHAV-C/DuCV 混合感染阳性率为 0.34%。结论: 成功建立了一种能同时鉴别检测 DTMUV、DHAV-C、DuCV 的一步法多重 PCR, 可用于临床中 3 种病毒单独感染或混合感染的鉴别检测和流行病学调查。

关键词: 鸭坦布苏病毒; 基因 C 型鸭甲肝病毒; 鸭圆环病毒; 多重 PCR; 鉴别

中图分类号: S855.3 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2025)02-0118-06

Establishment and application of a one-step multiplex PCR identification and detection method for ducktambous virus, genotype C duck hepatitis A virus, and duck circovirus

AI Weichang¹, LIU Yanmei², CHEN Zhenhui^{1*}

(1. Henan Provincial Wildlife Conservation Center, Zhengzhou 450044, China;

2. Henan Agricultural Vocational College, Zhengzhou 451450, China)

Abstract: In order to establish a multiplex PCR method for rapid identification and detection of DTMUV, DHAV-C and DuCV, specific detection primers were designed based on the DTMUV E gene sequence, DHAV-C VP1 gene sequence, and DuCV Cap gene sequence in GenBank. A one-step multiplex PCR method for differential detection of DTMUV, DHAV-C and DuCV was established. This method amplified 720, 480 and 250 bp fragments for DTMUV, DHAV-C and DuCV, respectively. No amplification products were found for DHAV-A, NDV, AIV-H9, DEV, DPV and MDRV. The minimum detection limits for DTMUV, DHAV-C and DuCV were 3.8×10^{-5} , 5.4×10^{-5} and 6.2×10^{-5} $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, respectively. The compliance rate with DTMUV, DHAV-C and DuCV single PCR methods was 100%. This method detected a DTMUV positive rate of 8.97%, DHAV-C positive rate of 10.69%, DuCV positive rate of 2.07%, DTMUV/DuCV mixed infection positive rate of 4.14%, DHAV-C/DuCV mixed infection positive rate of 3.10%, and DTMUV/DHAV-C/DuCV mixed infection positive rate of 0.34% in 290 clinical samples. It indicated that a one-step multiplex PCR detection method that can simultaneously distinguish and detect DTMUV, DHAV-C and DuCV, which can be used for the differential detection and epidemiological investigation of DTMUV, DHAV-C, and DuCV single or mixed infections in clinical practice.

Keywords: DTMUV; DHAV-C; DuCV; multiple PCR; identification

收稿日期: 2024-03-13; 修回日期: 2024-12-04

第一作者: 艾伟昌, 男, 本科, 农业技术推广研究员

* 通信作者: 陈振辉, 本科, 高级工程师, 主要从事野生动物疫源疫病监测和野生动物保护工作, E-mail: 121997935@qq.com。

鸭坦布苏病毒 (DTMUV) 属于黄病毒科瘟病毒属的单股正链 RNA 病毒, 2011 年被正式命名为 DTMUV, 由该病毒导致的水禽坦布苏病毒病 2010 年在我国开始暴发流行; 水禽坦布苏病毒病没有季节性, 一年四季均可发生, 可以感染肉鸭、蛋鸭、种鸭^[1-2]。鸭甲肝病毒 (DHAV) 属于微 RNA 病毒科禽肝病毒属成员, 包括基因 A 型、B 型和 C 型 3 种基因型, 基因 C 型是当前主要流行的毒株^[3]。DHAV-C 主要感染雏鸭, 病鸭感染后 2~3 d 死亡, 呈现角弓反张姿势, 剖检可见肝脏出血^[4]。鸭圆环病毒 (DuCV) 可以感染各种日龄和品种的鸭, 感染鸭出现发育不良, 生长迟缓, 感染后免疫力下降^[5], 容易发生多病原混合感染, 近年来 DuCV 混合感染呈上升趋势, 给养鸭业带来健康威胁^[6]。DTMUV、DHAV-C、DuCV 是当前鸭场主要感染病原, 为开展本地区鸭场多病原的快速检测, 加强鸭病毒病的流行病学监测, 本研究以 DTMUV、DHAV-C、DuCV 流行毒株的序列为参考, 建立可同时检测 DTMUV、DHAV-C、DuCV 的多重 PCR 鉴别检测方法, 为鸭场多病原检测提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 毒株来源

DTMUV、DHAV-C、DuCV、DHAV-A、新城疫病毒 (NDV)、H9 亚型禽流感病毒 (AIV-H9)、鸭瘟病毒 (DEV)、鸭细小病毒 (DPV)、鸭呼肠孤病毒 (MDRV) 毒株均为本实验室分离保存。

1.2 试验试剂

病毒 DNA/RNA 提取试剂盒, 购自 Axygen 公司; DL2000 DNA Marker、一步法 RT-PCR 扩增试剂, 均购自宝生物工程 (大连) 有限公司。

1.3 引物设计及单项 PCR 扩增

分别参考 DTMUV E 基因序列 (LN849068)、DHAV-C VP1 基因序列 (MN912703.1)、DuCV Cap 基因序列 (MZ425925.1) 设计 DTMUV、DHAV-C、DuCV 扩增引物, 引物信息如表 1 所示。利用病毒 DNA/RNA 提取试剂盒提取 DTMUV、DHAV-C、DuCV 的基因组, 依次利用一步法 RT-PCR 扩增试剂盒进行扩增。一步法 PCR 反应体系: 一步法扩增缓冲液 12.5 μL , 一步法扩增酶 0.5 μL , 上下游引物各 0.5 μL , 模板 1 μL , 水 10 μL 。一步法 PCR 反应程序: 50 $^{\circ}\text{C}$ 45 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 54 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 60 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。PCR 扩增结束后进行核酸电泳观察结果。

表 1 引物信息

引物名称	引物序列 (5'→3')	扩增片段长度/bp
DTMUVF	CACAACCTCCAAGGCGACT	720
DTMUVR	ATGCCCAGTGTCACTAGGATT	
DHAV-CF	ATGCTTCTCTGTTGCGCTTCT	480
DHAV-CR	GAAATGGCGCATGCTTG	
DuCVF	TGGGCTTAGGTACGAAGT	250
DuCVR	ACAGGCAACAAACCGTTCTAC	

1.4 多重 PCR 扩增

利用提取的 DTMUV、DHAV-C、DuCV 基因组 DNA/RNA, 用一步法试剂进行 RT-PCR 扩增, 扩增体系: 一步法扩增缓冲液 12.5 μL , 一步法扩增酶 0.5 μL , DTMUV、DHAV-C、DuCV 的上下游引物各 0.5 μL , DTMUV、DHAV-C、DuCV 核酸各 1 μL , 水 6 μL 。扩增程序: 50 $^{\circ}\text{C}$ 45 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 54 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 60 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。PCR 扩增结束后经核酸电泳观察结果。

1.5 多重 PCR 反应条件的确定

1.5.1 多重 PCR 引物浓度的确定

根据 1.4 中的反应体系和反应程序, DTMUV、DHAV-C、DuCV 的上游和下游引物分别各加 0.1、0.3、0.5、0.7 和 0.9 μL , PCR 扩增结束后经核酸电泳观察结果, 确定最佳引物浓度。

1.5.2 多重 PCR 退火温度的确定

根据 1.4 中的反应体系和反应程序, 退火温度分别选择 52、53、54、55、56 $^{\circ}\text{C}$, PCR 扩增结束后经核酸电泳观察结果, 确定最佳退火温度。

1.6 多重 PCR 特异性试验

提取 DTMUV、DHAV-C、DuCV、DTMUV/DHAV-C/DuCV (DTMUV、DHAV-C、DuCV 的混合基因组)、DHAV-A、NDV、AIV-H9、DEV、DPV、MDRV 的基因组 DNA/RNA, 利用建立的多重 PCR 检测方法进行 PCR 扩增, 验证检测方法的特异性。

1.7 多重 PCR 敏感性试验

测定得知 DTMUV、DHAV-C、DuCV 基因组 DNA/RNA 浓度分别为 0.38、0.54 和 0.62 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 每种病毒的基因组用灭菌水进行 10 倍系列稀释, 分别选择 $1 \times 10^{-1} \sim 1 \times 10^{-5}$ 梯度 DTMUV、DHAV-C、DuCV 模板各加 1 μL , 按建立的 PCR 体系和程序分别进行 PCR 扩增, 验证检测方法的敏感性。

1.8 多重 PCR 重复性试验

按照建立的多重 PCR 检测方法, 选择不同的时间对检测为 DTMUV、DHAV-C、DuCV 阳性的 3 份样品和检测为阴性的 3 份样品进行 3 次重复检测, 验证该检测方法的重复性。

1.9 多重 PCR 扩增产物测序鉴定

将 DTMUV、DHAV-C、DuCV PCR 检测为阳性的样品送生工生物工程（上海）股份有限公司测序鉴定。

1.10 临床样品检测与分析

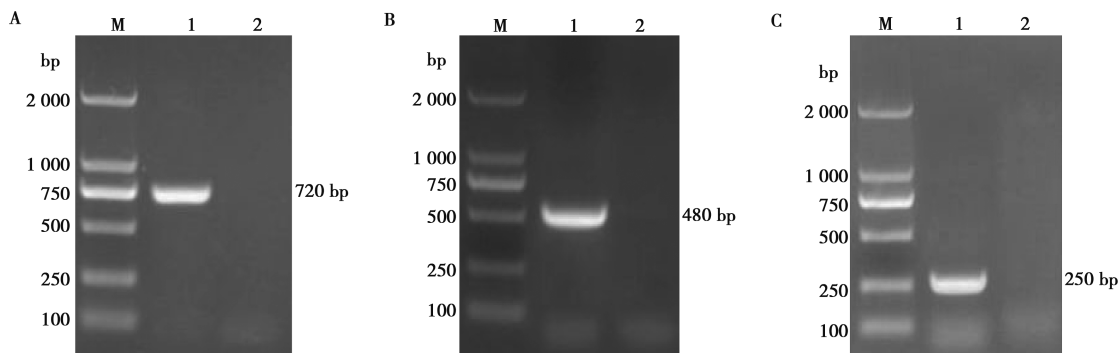
采集河南省部分地区临床发病或死亡鸭病料样品 290 份，用建立的 DTMUV、DHAV-C、DuCV 多重 PCR 检测方法进行检测，并分别与 DTMUV、DHAV-

C、DuCV 单项 PCR 检测方法进行比较，分析各病毒感染阳性率及混合感染的阳性率，为分子流行病学调查提供数据支持。

2 结果与分析

2.1 单项 PCR 扩增

如图 1 所示，DTMUV、DHAV-C、DuCV 扩增片段大小分别为 720、480、250 bp，均与预期一致。

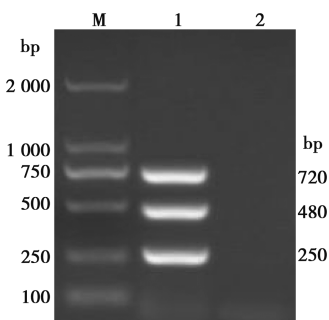


M. DL2000 DNA Marker; 1. 阳性对照; 2. 阴性对照。

图 1 DTMUV (A)、DHAV-C (B)、DuCV (C) PCR 扩增

2.2 DTMUV、DHAV-C、DuCV 多重 PCR 扩增

如图 2 所示，DTMUV/DHAV-C/DuCV 混合核酸可同时扩增出 720、480、250 bp 片段，与预期一致。



M. DL2000 DNA Marker; 1. DTMUV/DHAV-C/DuCV; 2. 阴性对照。

图 2 多重 PCR 扩增

2.3 多重 PCR 反应条件的确定

2.3.1 多重 PCR 引物浓度的确定

当多重 PCR 反应体系中 DTMUV、DHAV-C、DuCV 的上游和下游引物分别各加 0.5 μL 时，PCR

扩增条带最清晰，所以多重 PCR 为体系中 DTMUV、DHAV-C、DuCV 上游和下游最佳引物浓度分别各为 0.5 μL 。

2.3.2 多重 PCR 退火温度的确定

当退火温度为 54 $^{\circ}\text{C}$ 时，PCR 扩增条带最清晰，所以多重 PCR 最佳退火温度为 54 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.4 多重 PCR 特异性试验

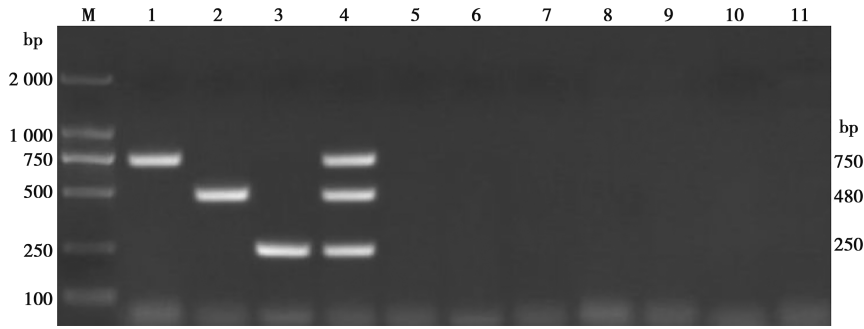
如图 3 所示，检测 DTMUV、DHAV-C、DuCV、DTMUV/DHAV-C/DuCV 均为阳性，而 DHAV-A、NDV、AIV-H9、DEV、DPV、MDRV 均无扩增产物。

2.5 多重 PCR 敏感性试验

如图 4 所示，在 1×10^{-4} 模板稀释后可以扩增出目的条带，说明 DTMUV、DHAV-C、DuCV 最低检测限度分别为 3.8×10^{-5} 、 5.4×10^{-5} 、 6.2×10^{-5} $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。

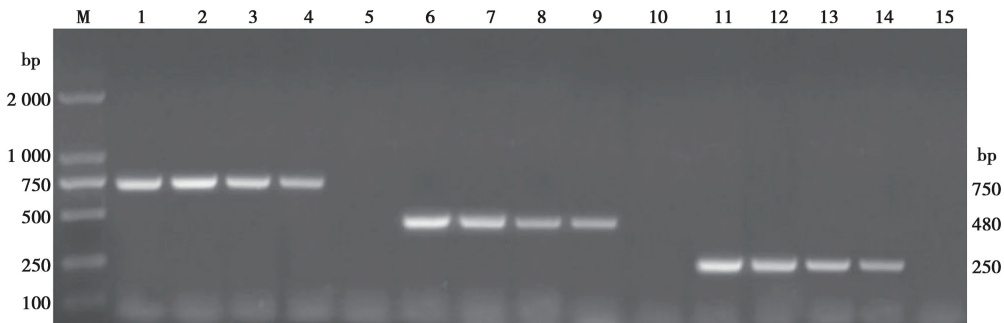
2.6 多重 PCR 重复性试验

如表 2 所示，DTMUV、DHAV-C、DuCV 各 3 份阳性样品在 3 次检测中均为阳性，DTMUV、DHAV-C、DuCV 各 3 份阴性样品在 3 次检测中均为阴性，说明检测方法有很好的重复性。



M. DL2000 DNA Marker; 1. DTMUV; 2. DHAV-C; 3. DuCV; 4. DTMUV/DHAV-C/DuCV; 5. DHAV-C; 6. NDV; 7. AIV-H9; 8. DEV; 9. DPV; 10. MDRV; 11. 阴性对照。

图3 特异性试验



M. DL2000 DNA Marker; 1~5. DTMUV $1 \times 10^{-1} \sim 1 \times 10^{-5}$ 梯度模板; 6~10. DHAV-C $1 \times 10^{-1} \sim 1 \times 10^{-5}$ 梯度模板; 11~15. DuCV $1 \times 10^{-1} \sim 1 \times 10^{-5}$ 梯度模板。

图4 敏感性试验

表2 重复性试验

病原	样品编号	第1次	第2次	第3次
DTMUV	阳性样品1	+	+	+
	阳性样品2	+	+	+
	阳性样品3	+	+	+
	阴性样品1	-	-	-
	阴性样品2	-	-	-
	阴性样品3	-	-	-
DHAV-C	阳性样品1	+	+	+
	阳性样品2	+	+	+
	阳性样品3	+	+	+
	阴性样品1	-	-	-
	阴性样品2	-	-	-
	阴性样品3	-	-	-
DuCV	阳性样品1	+	+	+
	阳性样品2	+	+	+
	阳性样品3	+	+	+
	阴性样品1	-	-	-
	阴性样品2	-	-	-
	阴性样品3	-	-	-

备注：“+”表示阳性，“-”表示阴性。

2.7 多重PCR测序鉴定

DTMUV、DHAV-C、DuCV PCR检测为阳性的样品经测序鉴定分别为DTMUV、DHAV-C、DuCV特异性序列，检测结果准确可靠。

2.8 临床样品检测与分析

通过对290份临床发病或死亡鸭样品进行检测，建立的一步法多重PCR方法与DTMUV、DHAV-C、DuCV单项PCR方法的符合率均为100%。对290份样品的检测结果进行统计，结果如表3所示，共检出DTMUV阳性样品39份，DHAV-C阳性样品41份，DuCV阳性样品28份，其中DTMUV阳性率为8.97% (26/290)，DHAV-C阳性率为10.69% (31/290)，DuCV阳性率为2.07% (6/290)，DTMUV/DuCV混合感染阳性率为4.14% (12/290)，DHAV-C/DuCV混合感染阳性率为3.10% (9/290)，DTMUV/DHAV-C/DuCV混合感染阳性率为0.34% (1/290)。表明河南省部分地区DTMUV、DHAV-C、DuCV的感染较多，混合感染情况较多，以2种或3种病原混合感染为主。

表 3 临床样品检测 ($n=290$)

病原	阳性数/份	阳性率/%
DTMUV	26	8.97
DHAV-C	31	10.69
DuCV	6	2.07
DTMUV/DHAV-C	0	0
DTMUV/DuCV	12	4.14
DHAV-C/DuCV	9	3.10
DTMUV/DHAV-C/DuCV	1	0.34

3 讨论

近年来我国水禽养殖业发展较快,随着养殖规模扩大及动物运输频繁,导致水禽疫病感染情况日益复杂,尤其是鸭感染的病毒病不断增多^[7],加快疾病的诊断是目前养殖企业的迫切要求。鸭病毒病的诊断方法包括病毒分离、常规 PCR、ELISA 和荧光定量 PCR 检测方法^[8]。病毒分离方法虽然准确可靠,但是试验周期较长,有时需要在鸡胚、鸭胚或细胞上盲传几代才能分离成功^[9];常规的 PCR 检测方法不能满足多种疾病混合感染快速检测的需求^[10];ELISA 方法在病毒抗体检测中应用较多^[11],与检测病原相比具有一定的滞后性;荧光定量 PCR 检测方法对试验的仪器设备要求较高,检测成本较高,一般基层实验室很难满足^[12]。多重 PCR 是在常规 PCR 的基础上,同时有 2 个或多个目的基因在一个反应体系中进行扩增的技术^[13]。多重 PCR 可以同时扩增多个特异性片段,降低了试验成本,同时提高了检测效率。多重 PCR 技术在动物疾病的检测及诊断中逐步发挥重要作用^[14-16]。

本研究参考 GenBank 中 DTMUV E 基因序列 (LN849068),DHAV-C VP1 基因序列 (MN912703.1),DuCV Cap 基因序列 (MZ425925.1) 设计特异性检测引物,预期扩增片段大小分别为 720、480、250 bp,建立了同时检测 DTMUV、DHAV-C、DuCV 的多重 PCR 鉴别检测方法,扩增的各病毒均为特异性序列,根据扩增片段的大小差异很容易进行鉴别诊断。在特异性试验中,DTMUV、DHAV-C、DuCV 分别扩增出 720、480、250 bp 片段,与预期一致,而 DHAV-A、NDV、AIV-H9、DEV、DPV、MDR 均无扩增产物。在敏感性试验中,DTMUV、DHAV-C、DuCV 在模板 1×10^{-4} 稀释后可以扩增出目的条带,DTMUV、DHAV-C、DuCV 最低检测限度分别为 3.8×10^{-5} 、 5.4×10^{-5} 、 6.2×10^{-5} $\mu\text{g}/\mu\text{L}$,说明多重 PCR 方法有很好的敏感性。在建立多重 PCR 检测方法时,既要考虑引物浓度对 PCR 反应的影响,又要考虑退火温

度对 PCR 反应的影响,所以本研究在建立多重 PCR 检测方法时,对引物浓度和退火温度均进行了优化,最终确定多重 PCR 体系中 DTMUV、DHAV-C、DuCV 上游和下游最佳引物浓度分别均为 $0.5 \mu\text{L}$,多重 PCR 最佳退火温度为 $54 \text{ }^\circ\text{C}$ 。本研究借鉴向萌等^[17]、张闫等^[18]的方法,在建立多重 PCR 方法时使用了商品化一步法扩增试剂,在一个反应体系中同时实现 RNA 和 DNA 病毒的扩增。在配制好反应体系后,整个反应均在 PCR 仪内完成,不需要中途打开盖子,减少了污染机会,整个多重 PCR 反应在 6 h 内完成,而且可同时检测 DTMUV、DHAV-C、DuCV 进行检测,大大提高了检测效率。总之,本研究建立的 DTMUV、DHAV-C、DuCV 多重 PCR 方法可用于鸭场 3 种疫病其中的 1 种感染、2 种或者 3 种混合感染的检测,提高了疫病诊断的全面性和准确性,加快了疫病诊断效率,为鸭场疾病的快速诊断及流行病学调查奠定基础。

随着病毒病对水禽养殖产业危害的逐步加剧,研究学者日益重视水禽病毒病感染状况与流行趋势的监测分析。陈长福^[19]采用 RT-PCR 方法对采集于福建省龙岩市的 2 885 份鸭泄殖腔棉拭子进行 DTMUV 病原学检测,阳性率为 16.81% (485/2 885)。刘性坡等^[20]采用 RT-PCR、荧光定量 PCR 等方法对采集于山东的 270 份临床样品进行 DTMUV 病原学检测,阳性率为 13.3% (36/270)。向萌等^[21]采用 RT-PCR 方法对采集于四川的 410 份临床病料样品进行 DHAV-C 病原学检测,阳性率为 28.78% (118/410)。熊陈勇等^[22]采用实时荧光定量 PCR 方法对采集于广西地区的 761 份病死鸭临床样本进行 DuCV 病原学检测,阳性率为 22.5% (171/761)。白冰等^[23]采用 PCR 方法对采集于广东省的 910 份临床鸭组织病料进行 DuCV 病原学检测,阳性率为 23.18% (211/910)。甘一波等^[24]采用 PCR 方法对采集于广西省玉林市的 856 份病死鸭样品进行 DuCV 病原学检测, DuCV 阳性率为 10.63% (91/856)。本研究利用建立的多重 PCR 方法对采集于河南省部分地区 290 份临床病料样品进行检测,共检出 DTMUV 阳性样品 39 份, DHAV-C 阳性样品 41 份, DuCV 阳性样品 28 份,检测结果与上述研究学者的研究结果具有一致性,表明当前鸭场中 DTMUV、DHAV-C、DuCV 的感染较多。同时,本研究发现 DTMUV/DuCV 混合感染阳性率为 4.14% (12/290), DHAV-C/DuCV 混合感染阳性率为 3.10% (9/290), DTMUV/DHAV-C/DuCV 混合感染阳性率为 0.34% (1/290),表明 DuCV 极易与 DTMUV、DHAV-C 发生混合感染。由于鸭感染 DuCV 后会造成机体的免疫抑制,进而导致

其他致病原的感染,混合感染加重疾病的严重程度和死亡率,应采取综合性防控措施来提高鸭场的生物安全和鸭群的抗病力,减少混合感染。总之,本研究调查结果为掌握河南省DTMUV、DHAV-C、DuCV的感染态势提供了数据支撑,为我国鸭病毒病的综合防控提供了依据。

参考文献:

- [1] 胡自强,黄允真,张俊勤,等.坦布苏病毒GX株对雏鸭的感染性和致病性试验[J].动物医学进展,2023,44(10):1-6.
- [2] 唐皓雪,贾仁勇.四川省鸭坦布苏病毒的分离鉴定及遗传进化分析[J].病毒学报,2022,38(5):1173-1181.
- [3] 张玉倩,姚鑫炎,杨惠湖,等.2株3型鸭甲肝病毒广东分离株的鉴定与遗传进化分析[J].黑龙江畜牧兽医,2022(24):69-75.
- [4] 曹维伟,魏中锋,李娇,等.4株基因C型鸭甲肝病毒的分离鉴定与VP1基因序列分析[J].中国动物传染病学报,2022,30(2):1-6.
- [5] 姚鑫炎,吕志航,张玉倩,等.鸭圆环病毒编码蛋白功能研究进展[J].特产研究,2022,44(4):146-149.
- [6] 吴冬梅,金鸿,张霞,等.某鸭场多种病原混合感染病例的实验室诊断[J].贵州畜牧兽医,2021,45(6):38-40.
- [7] 郝桂英,陈玲,殷蓓蓓,等.鸭坦布苏病毒病的研究进展[J].中国畜禽种业,2023,19(1):7-12.
- [8] 陈吉敏,李辉煌,赖连杰,等.鸭坦布苏病毒检测方法及其疫苗研究进展[J].中国畜牧兽医,2023,50(4):1329-1339.
- [9] 李群,丁国伟,窦莉莎,等.鸭坦布苏病毒的分离、鉴定及致病性研究[J].家禽科学,2023,45(3):6-11.
- [10] PATCHAREEPORN N, WIKANDA T, DUANGDUEAN P, et al. Development and validation of a universal one-step RT-PCR assay for broad detection of duck Tembusu virus [J]. Avian Dis, 2020, 64(3): 294-299.
- [11] SHAN Z, SHENG Y Z, MING S W, et al. Development and evaluation of an indirect ELISA based on recombinant nonstructural protein 3A to detect antibodies to duck hepatitis A virus type 1 [J]. J Virol Methods, 2019, 268: 56-61.
- [12] SHUAI Z, WEI H L, XIAO D L, et al. A TaqMan-based real-time PCR assay for specific detection of novel duck reovirus in China [J]. BMC Vet Res, 2020, 16(1): 306.
- [13] 曲哲会,张喜文,鲁绍芳,等.鸭瘟病毒、鸭坦布苏病毒和鸭疫里默杆菌多重PCR检测方法的建立与初步应用[J].中国兽医学报,2023,43(6):1175-1180.
- [14] 姚鑫炎,孙静,刘宏,等.鹅4种常见病毒多重PCR检测方法的建立及初步应用[J].中国兽医学报,2022,42(11):2190-2194.
- [15] 张红,田秋丰,王志强,等.鹅星状病毒鹅细小病毒和鹅坦布苏病毒三重PCR检测方法的建立与应用[J].中国兽医科学,2023,53(2):163-169.
- [16] YIN D, MEI Z L, XIAO M H, et al. Development and application of a multiplex PCR method for simultaneous detection of waterfowl parvovirus, duck enteritis virus and goose astrovirus [J]. Biotech, 2022, 12(9): 205.
- [17] 向萌,任玉鹏,王一丹.PRRSV、基因2型CSFV、PRV和JEV一步法多重RT-PCR检测方法的建立[J].黑龙江畜牧兽医,2022(10):76-81.
- [18] 张闰,郭福强,刘小琛,等.四种牛病毒性呼吸道病一步法多重PCR方法的建立与应用[J].中国兽医科学,2023,53(11):1390-1397.
- [19] 陈长福.2020年福建省龙岩市水禽坦布苏病毒检测及其NS5基因变异分析[J].中国动物检疫,2022,39(9):47-53.
- [20] 刘性坡,刘友香,李宁,等.山东地区鸭坦布苏病毒流行病学调查及分子变异分析[J].中国预防兽医学报,2018,40(7):575-580.
- [21] 向萌,张焕容,岳华,等.四川地区4株基因C型鸭甲肝病毒的分离鉴定及全基因组测序分析[J].中国预防兽医学报,2021,43(1):14-20.
- [22] 熊陈勇,曾素先,刘惠心,等.2019—2022年广西鸭圆环病毒分子流行病学研究[J].中国畜牧兽医,2024,51(1):373-381.
- [23] 白冰,张卫兴,何婉婷,等.2018—2020年广东鸭圆环病毒流行病学调查[J].中国动物传染病学报,2021,29(1):80-84.
- [24] 甘一波,段振华.2016—2019年广西玉林市送检病死鸭的鸭圆环病毒检测[J].中国动物检疫,2020,37(9):21-24.