獸醫研究所研報 No.2：71~80 (2024)

建立用於檢測新型坦布蘇病毒的即時定量反轉錄聚合酶鏈反應檢測方法

陳燕萍*、鄧明中

農業部獸醫研究所

摘要　本研究中，我們開發一步式定量即時反轉錄聚合酶鏈反應（quantitative real-time RT-PCR, RT-qPCR）以檢測坦布蘇病毒。根據臺灣坦布蘇病毒 NS5 基因序列設計引子和探針，用於 RT-qPCR 擴增 119 bp 核酸片段。RT-qPCR 的檢測極限為 20 個拷貝數。RT-qPCR 的標準曲線涵蓋較寬的範圍（2×10^1～2×10^{10} RNA 拷貝數），並表現出高度線性關係，相關係數為 0.999。而且，其他重要病原均未被檢出也證實其偵測專一性。此外，RT-qPCR 成功檢測臨床樣本中的 NS5 基因。新開發的 RT-qPCR 檢測方法表現出良好的偵測極限性和偵測專一性，可提供作為具信賴度、偵測專一性與快速的檢測和定量分析坦布蘇病毒的方法。

關鍵詞：坦布蘇病毒、定量、即時反轉錄聚合酶鏈反應、拷貝數

緒言

坦布蘇病毒（Tembusu virus, TMUV）屬於黃病毒科（*Flaviviridae*）黃病毒屬（*Flavivirus*），是一種新興的蟲媒病毒，最初於 1955 年從馬來西亞的三帶喙庫蚊（*Culex tritaeniorhynchus*，又名三斑家蚊）中被發現，命名為 TMUV MM1775 [11]，之後在 1970 年代東南亞的不同調查中偶爾有報告。2000 年，馬來西亞分離出一種源自雞的 TMUV，名為實兆遠病毒（Sitiawan virus，STWV），它可引起肉雞腦炎和生長遲緩 [5]。自 2010 年中國開始有鴨隻感染 TMUV 而造成嚴重產蛋下降症候群疫情 [14, 18]，之後疫情蔓延到馬來西亞和泰國的養鴨場 [3, 10, 16]。在臺灣，坦布蘇病毒最先於 2019 年在庫蚊（TP1906 株）與鴨場（1080905 株）被發現，之後在鵝場（NTU / C225 / 2020 株）也有報告 [1, 2, 6, 12]。

除了嚴重的產蛋下降外，坦布蘇病毒還會導致感染鴨隻食慾下降、抑鬱、生長遲緩、腹瀉和神經功能障礙。其發病率為 90%～100%，死亡率為 5%至 15%，偶爾因繼發性細菌感染而增加至 30% [3, 16, 18]。文獻指出，TMUV 也會在雞和鵝中引起類似的臨床症狀，並且該病毒也已從蚊子、鴿子和麻雀中被分離出 [7, 8, 15, 19]。

與其他黃病毒相同，TMUV 的基因體長度約為 11 kb，為線性單股正向 RNA，當病毒感染細胞時，病毒 RNA 首先轉譯成單一個多蛋白（polyprotein），之後此多蛋白被蛋白酶裂解，形成十種功能蛋白，包括三種結構蛋白，為衣殼蛋白（capsid protein, C）、前膜蛋白（pre-membrane protein, prM）和封套蛋白（envelope protein, E），以及七種非結構蛋白（NS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、2k-NS4B 和 NS5）[8]。結構蛋白參與病毒顆粒的形成、附著和進入宿主細胞，而非結構蛋白參與病毒複製、組裝、蛋白水解、成熟和宿主免疫調節 [13]。

親緣分析學上，Ninvilai 等人將 TMUV 分為兩個譜系，即鴨 TMUV 譜系和 TMUV 譜系，並進一步將鴨 TMUV 譜系分為三個不同的群：群 1、群 2（由亞

* 抽印本索取作者
農業部獸醫研究所

群 2.1 和 2.2 組成）和群 3 [10]。TMUV MM1775、STWV 與 TP1906 歸入 TMUV 譜系。在鴨 TMUV 譜系中，群 1 由來自馬來西亞和泰國的鴨 TMUV 組成，群 2 包含來自泰國和中國的鴨 TMUV，群 3 亦包含來自泰國和中國的鴨 TMUV [12]，而臺灣的 TMUV（TP1906、1080905 與 NTU / C225 / 2020）則與 TMUV MM1775、STWV 歸在同一群中 [1, 2, 6, 12]。

目前可用於檢測 TMUV 的方法有多種，包括病毒分離、傳統反轉錄聚合酶鏈反應（RT-PCR）、環形恆溫擴增法（loop-mediated isothermal amplification, LAMP）與基於 Taqman 探針的即時 RT-PCR（real-time RT-PCR；RT-qPCR）。病毒分離通常被認為是檢測 TMUV 感染的「黃金標準」，但是病毒分離通常需要花費 4–5 天，甚至超過 1 週的時間。RT-PCR、LAMP 與 RT-qPCR 技術靈敏、特異且高效，但是需要設計特定的引子與探針以符合地區流行病毒株的核酸序列 [4, 9, 17]。本研究即為建立適合檢測臺灣坦布蘇病毒的基於 TaqMan 的 RT-qPCR 檢測方法。

材料與方法

病毒

本研究所使用病毒株 TMUV 1080905 為農業部獸醫研究所於 2019 年分離自具產蛋下降症狀的北京鴨 [2]。

核酸萃取

TMUV、水禽其他常見病原與待測檢體以 MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I（Roche Diagnostics, Mannheim, Germany）依廠商提供之說明書進行核酸萃取。

引子與探針

傳統 RT-PCR 引子為使用 Chen 等人於 2022 年發表文獻中，為 BYD2113F, 5'-TGGAGAAACTGG-CAAGAAGT-3' 與 BYD2543R, 5'-TCCCTCTTTCCAA GGTATGG-3'，預期產物長度為 431 bp [2]。

RT-qPCR 使用之引子與探針為依據臺灣分離之 TMUV 的 NS5 基因，包括鴨來源的 1080905 病毒株（Accession number: MW922032）、蚊子來源的 TP-1906 病毒株（Accession number: MN747003）與鵝來源的 NTU / C225 / 2020 病毒株（Accession number: MW821486）的 NS5 核酸序列設計而來。引子對為 BYD-7809F 5'-GCATCCAGTTTCACGA GGCA-3'、BYD-7927R 5'-CGCAGTAGTAGCTCCAG CCT-3'，探針為 BYD-7907P FAM-CCTCGGCCGCA GCCCAAGTCCA-QSY，預期產物大小為 119 bp。

標準 RNA 核酸的製備

以上述 RT-qPCR 使用之引子對利用 RT-PCR 增幅產生 119 bp 的核酸片段，並依據廠商提供之操作手冊進行以下步驟。首先，使用 QIAGEN PCR Purification kit（Qiagen, Hilden, Germany）純化 PCR 產物，再將 PCR 產物的核酸片段嵌插入 pCR2.1-TOPO 載體（Invitrogen, California, USA）中，以 M13 引子進行菌落 PCR（colony PCR），產生含 T7 promoter 及 RT-qPCR 目標產物片段序列之核酸，以電泳確認 M13 PCR 確實成功，以 QIAquick Gel Extraction kit（QIAGEN）進行電泳膠中的 PCR 產物核酸純化，之後利用 AmpliScribe™ T7-Flash™ Transcription Kit（LGC Limited, UK）將 PCR 產物 DNA 轉錄為 RNA，經 DNase I 處理後再進一步以 RNeasy Mini kit（Qiagen）進行 RNA 純化，利用分光光度計 Qubit™ 4 Fluorometer（Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, Massachusetts, U.S.）測量純化的 RNA 核酸的濃度，並使用下式計算載體拷貝數（copy number）：

拷貝數（copy number/μL）= [（RNA 濃度 ng/μL）×（6.02×10^{23} molecules/mole）]÷[（RNA 長度 bp × 330 g/mol）×（1×10^{9} ng/g）]。

傳統 RT-PCR 與 RT-qPCR

傳統 RT-PCR 方法為沿用 Chen 等人於 2022 年發表的文獻 [2]，而 RT-qPCR 則以前述引子 BYD-7809F 與 BYD-7927R 以及探針 BYD-7907P 進行，預期產物為 119 bp。RT-qPCR 為利用 LightCycler 480 System（Roche Diagnostics GmbH,

Mannheim, Germany）機器進行，反應液為含 Platinum™ Taq DNA Polymerase（Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc., CA, USA）0.5 μL、RNasin® Ribonuclease Inhibitor（Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA）0.2 μL、1 倍緩衝液、各 400 nM 正向和反向引子與 160 nM 探針、5 μL 核酸，加水至總體積 25 μL。反應條件則為 50℃ 30 分鐘與 95℃ 3 分鐘後進行 45 個循環之 95℃ 15 秒，60℃ 30 秒與 72℃ 20 秒。

RT-qPCR 偵測極限

為檢測 RT-qPCR 的偵測極限，將上述製備之標準核酸分別進行 10 倍連續稀釋，核酸量範圍為 $2 \times 10^{10} \sim 2 \times 10^{1}$ 拷貝數 / 反應，再進行上述之 RT-qPCR。

RT-qPCR 偵測專一性

以鵝小病毒、鴨小病毒、鵝出血性多瘤病毒、鵝環狀病毒、鴨環狀病毒、鴨肝炎病毒、新城病病毒、禽流感病毒、坦布蘇病毒、雷氏桿菌、金黃葡萄球菌、巴士德桿菌與沙門氏菌之核酸進行 RT-qPCR 之偵測專一性試驗。

RT-qPCR 的重複性（repeatability）分析

為了評估 RT-qPCR 的變異係數（coefficient variation, CV），利用連續 10 倍稀釋的標準核酸進行測試（濃度為 $2 \times 10^{7} \sim 2 \times 10^{1}$ 拷貝數 / 反應），將每個稀釋濃度的標準核酸進行三重複檢測，並根據標準偏差 / 幾何平均 Cp（crossing point）的公式計算 CV 值以評估批內重複性（intra-assay repeatability），而批間重複性（inter-assay repeatability）的 CV 值則來自三次不同時間的測量值之間的差異。

RT-qPCR 應用於臨床檢體

疑似坦布蘇病毒感染鴨、鵝場之臨床臟器檢體先以傳統 RT-PCR 檢測坦布蘇病毒核酸，臟器檢體包括心、肺、腦、肝、腎與十二指腸，為節省檢驗成本與時間，將心與肺混合，以及肝與腎混合後進行檢測，即每隻動物具 4 個核酸檢體。若送檢場中其中一個檢體之結果呈現坦布蘇病毒核酸陽性，該場之所有臟器檢體再以 RT-qPCR 進行檢測。為了解坦布蘇病毒在禽隻各個臟器病毒核酸量情形，請該場再送檢 3 隻水禽同時以傳統 RT-PCR 與 RT-qPCR 進行坦布蘇病毒核酸檢測。再送檢之臟器檢體包括心、肝、脾、肺、腎、腦、氣管、十二指腸、直腸、小腸、盲腸、前胃、胸腺和華氏囊，為單一種臟器分開個別檢測。

將前述混合或單一種臟器分別以滅菌後之磷酸緩衝鹽液製作成 10 倍乳劑，經 3,000 rpm 離心 10 分鐘後，取上清液進行核酸萃取；萃取之核酸分別進行傳統 RT-PCR 和 RT-qPCR 檢測。

結果

RT-qPCR

以含 $2 \times 10^{1} \sim 2 \times 10^{10}$ 拷貝數 / 反應的 TMUV 標準 RNA 檢測偵測極限，結果顯示 RT-qPCR 的檢測極限為 20 拷貝數，且標準核酸 $2 \times 10^{1} \sim 2 \times 10^{10}$ 拷貝數 / 反應的對數值與 Cp 值具線性相關，標準曲線為 $y = -3.5314x + 40.645$，且其線性相關性（R^2）為 0.999（圖 1）。

偵測專一性部分，RT-qPCR 僅 TMUV 核酸具陽性反應，其餘包括鵝小病毒、鴨小病毒、鵝出血性多瘤病毒、鴨肝炎病毒、禽流感病毒、新城病病毒、雷氏桿菌、家禽霍亂菌、金黃葡萄球菌、鏈球菌、沙門氏菌、大腸桿菌、鵝環狀病毒與鴨環狀病毒之核酸皆為陰性，顯示具偵測專一性。

重複性方面，利用連續 10 倍稀釋的標準核酸進行測試（濃度為 $2 \times 10^{7} \sim 2 \times 10^{1}$ 拷貝數 / 反應），將每個稀釋濃度的標準核酸進行三重複檢測。批內重複性之 CV 值為 0.1 ~ 1.77%，而批間重複性的 CV 值為 0.06 ~ 2.71%，顯示 RT-qPCR 有高的重複性（表 1）。

PCR 應用於臨床與檢疫檢體

於 109 年 1 月至 110 年 12 月共有來自 4 鴨場之 10 隻鴨與來自 6 鵝場之 20 隻鵝之臟器檢體，總計 10 水禽場共 30 隻水禽計 120 個核酸檢體進行傳統 RT-PCR 檢測，檢測結果為一鵝場於觀察到臨床症狀第 2 天送檢之 3 隻鵝共 12 個核酸檢體皆呈現坦布蘇病毒核酸陽性。

該鵝場於呈現臨床症狀後第 9 天再送檢 3 隻鵝共 41 個臟器（其中 1 隻鵝無採集華氏囊），臟器檢體於萃取核酸後亦進行傳統 RT-PCR 檢測。結果顯示僅第 1 隻之 14 個臟器皆呈現坦布蘇病毒核酸 RT-PCR 檢測陽性，第 2 隻與第 3 隻鵝臟器皆為陰性。

將上述坦布蘇病毒核酸陽性場二次送檢之所有 53 個檢體進行 RT-qPCR，檢測結果若 Cp 值為小於 37 認定為陽性。結果顯示第一次送檢之 3 隻鵝共 12 個檢體皆為陽性，第二次送檢之 3 隻鵝 41 個檢體中，僅第 1 隻鵝之 14 個檢體為陽性，第 2 隻鵝之心與第 3 隻鵝之直腸為陽性。各 RT-qPCR 陽性檢體之 Cp 值如（表 2）。

討論

TMUV 是一種新型黃病毒，可引起鴨嚴重疾病，導致產蛋量下降、採食量減少和卵巢與輸卵管病變，可對養鴨產業造成嚴重的經濟損失 [14, 18]。疾病的快速診斷對於疾病的預防與控制非常重要，高通量病原體檢測在許多診斷情況下皆很重要。RT-qPCR 方法允許使用於高通量的病原體檢測，因為它們可以在 96 孔盤中進行，且與傳統 RT-PCR 相比，該方法有幾個優點。例如，該檢測速度更快，可在大約 70 分鐘內篩選大量樣本，可以透過將樣品的螢光訊號與標準曲線進行比較來定量病毒 RNA，這消除了凝膠電泳的需要。此外，該方法可以量化病毒核酸的拷貝數以估計病毒量，因此需要建立 TMUV 的 RT-qPCR 快速檢測方法 [9, 17, 20]。

核酸親緣分析顯示，雖然臺灣的 TMUV 為與馬來西亞的病毒株 MM1775 與 STWV 屬同一群，而非與地理位置較近的中國病毒株在同一群，但臺灣 TMUV 與 MM1775 與 STWV 的核酸相似僅分別為 91.2%與 93.7%，與中國病毒株之核酸相似度更僅 86.4%～88.7% [1, 2, 12]，因此在建立 RT-qPCR 時首先須依據臺灣 TMUV 病毒株序列設計適合用於檢測臺灣病毒株的引子與探針。

本研究建立高偵測極限性與專一性之 RT-qPCR 方法。本研究透過 T7 RNA 聚合酶體外轉錄建構了含有目標基因序列的 TMUV RNA 標準品。使用體外合成的 RNA 標準品克服使用質體 DNA 作為 RT-qPCR 陽性對照的缺點，因此在定量分析上更加可靠和精確 [20]。

本研究也評估 RT-qPCR 檢測的敏感度、定量範圍和專一性，新的 RT-qPCR 具有高的敏感度，可以檢測至少 20 個病毒核酸拷貝數，且標準核酸 2×10^1 ～ 2×10^{10} 拷貝數的對數值與 Cp 值具線性相關，R^2 為 0.999，此與其他建立檢測 TMUV 的 RT-qPCR 的文獻結果相似，而且，本研究與其他文獻的 RT-qPCR 皆有良好之重複性結果 [4, 9, 20]。在專一性方面，RT-qPCR 僅對 TMUV 核酸產生陽性反應，其他水禽常見病原核酸之檢測結果為陰性，由此可知，本研究所建立之 RT-qPCR 具相當之偵測極限性與專一性。

本研究中為將傳統 RT-PCR 陽性禽場之檢體再進一步以 RT-qPCR 進行檢測，傳統 RT-PCR 結果為陰性而 RT-qPCR 為陽性之檢體，其坦布蘇病毒核酸量應已低於傳統 RT-PCR 之檢測極限，之後應再以更多的檢體同時以 2 種方法進行檢測以更了解此二種檢測方法之間的相關性。本研究證明 RT-qPCR 具有一定之偵測極限性外，可有效定量臨床樣本中的病毒量，顯示 RT-qPCR 除了可以取代傳統 RT-qPCR 進行臨床病例檢體之檢測，亦可反映病禽的病毒血症狀態，因此，RT-qPCR 可進一步應用於病毒致病機轉或其他相關研究。

本實驗室建立快速、高偵測極限性與高專一性 RT-qPCR 的 TMUV 檢測方法，且該方法是可以用於定量並可檢測大量臨床樣品，可作為常規診斷和研究應用的絕佳工具。

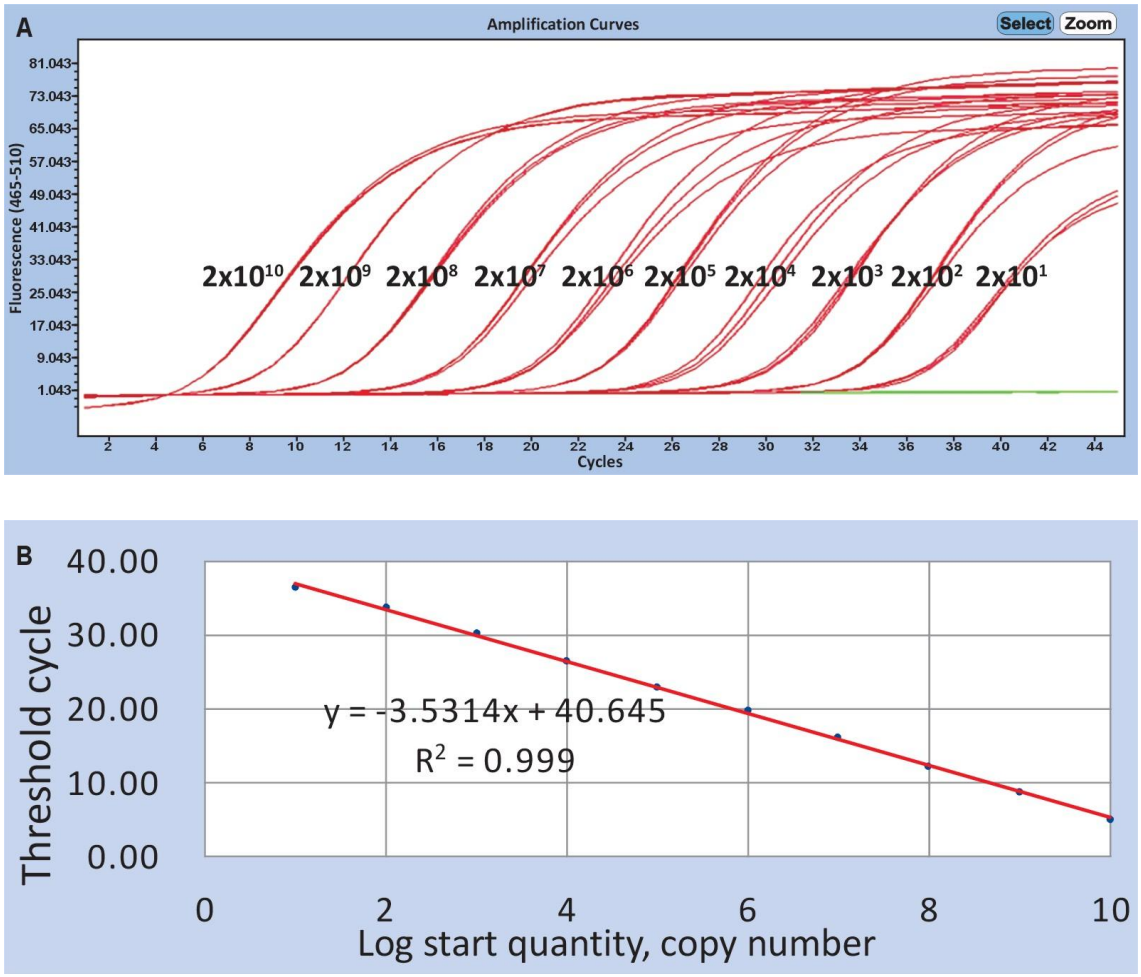

圖 1、坦布蘇病毒 RT-qPCR。

A：2 x 10^1 ~ 2 x 10^{10} 拷貝數 / 反應的坦布蘇病毒標準核酸之 RT-qPCR 增幅曲線，結果顯示檢測極限為 20 拷貝數。

B：RT-qPCR 的標準曲線顯示 10^1 ~ 10^{10} 拷貝數 / 反應的標準核酸對數值與 Cp（crossing point）具線性相關，標準曲線為 y = -3.5314x + 40.645，且其線性相關性（R^2）為 0.999。

獸醫研究所研報 No.2：71~80 (2024)

表 1、坦布蘇病毒 RT-qPCR 的批內重複性與批間重複性。

標準 RNA 濃度（copies）	批內變異性（Cp 值）			批間變異性（Cp 值）		
	平均值	標準偏差	變異係數（%）	平均值	標準偏差	變異係數（%）
2.0×10^7	16.07	0.28	1.77	16.17	0.14	0.87
2.0×10^6	19.74	0.15	0.77	19.84	0.08	0.42
2.0×10^5	23.27	0.28	1.18	23.39	0.30	1.29
2.0×10^4	26.90	0.10	0.38	26.76	0.46	1.73
2.0×10^3	30.39	0.42	1.37	30.79	0.02	0.06
2.0×10^2	33.97	0.31	0.91	34.08	0.10	0.30
2.0×10^1	36.44	0.04	0.10	37.65	1.02	2.71

表 2、坦布蘇病毒臨床檢體 RT-qPCR 檢測陽性結果之 Cp 值。

第一次送檢檢體	RT-qPCR（Cp 值）	第二次送檢檢體	RT-qPCR 結果（Cp 值）
心、肺	16.63、17.59、19.21	心	28.52、36.54
腦	20.74、24.44、24.57	肝	32.48
肝、腎	16.19、20.01、20.73	脾	31.76
十二指腸	20.05、22.09、19.93	肺	29.15
		腎	30.1
		腦	29.09
		氣管	26.47
		十二指腸	30.89
		直腸	31.05、36.4
		小腸	31.56
		盲腸	27.26
		前胃	30.92
		胸腺	27.11
		華氏囊	30.35

參考文獻

1. Chen YP, Huang CW, Lee F. Complete coding sequence of Tembusu virus isolated from geese in Taiwan in 2020. Microbiol Resour Announc, 12:e0025623, 2023.
2. Chen YP, Shih YH, Lee F, Chiou CJ. The first identification of Tembusu virus in a Pekin duck farm in Taiwan. J Appl Anim Res, 50:86-92, 2022.
3. Homonnay ZG, Kovács EW, Bányai K, Albert M, Fehér E, Mató T, Tatár-Kis T, Palya V. Tembusu-like flavivirus (Perak virus) as the cause of neurological disease outbreaks in young Pekin ducks. Avian Pathol, 43:552–560, 2014.
4. Jiang T, Liu J, Deng Y, Su J, Xu L, Liu Z, Li X, Yu X, Zhu S, Gao GF, Qin ED, Qin C. Development of RT-LAMP and real-time RT-PCR assays for the rapid detection of the new duck Tembusu-like BYD virus. Arch Virol, 157:2273–2280, 2012.
5. Kono Y, Tsukamoto K, Abd Hamid M, Darus A, Lian TC, Sam LS, Yok CN, Di KB, Lim KT, Yamaguchi S, Narita M. Encephalitis and retarded growth of chicks caused by Sitiawan virus, a new isolate belonging to the genus Flavivirus. Am J Trop Med Hyg, 63:94–101, 2000.
6. Liu M, Chen YY, Twu NC, Wu MC, Fang ZS, Dubruel A, Chang SC, Wu CF, Lo DY, Chen HW. A novel goose-origin Tembusu virus exhibits pathogenicity in day-old chicks with evidence of direct contact transmission. Poult Sci, 103:103332, 2024.
7. Liu M, Chen S, Chen Y, Liu C, Chen S, Yin X, Li G, Zhang Y. Adapted Tembusu-like virus in chickens and geese in China. J Clin Microbiol, 50:2807–2809, 2012.
8. Liu P, Lu H, Li S, Moureau G, Deng YQ, Wang Y, Zhang L, Jiang T, de Lamballerie X, Qin CF, Gould EA, Su J, Gao GF. Genomic and antigenic characterization of the newly emerging Chinese duck egg-drop syndrome flavivirus: genomic comparison with Tembusu and Sitiawan viruses. J Gen Virol, 93:2158–2170, 2012.
9. Liu Z, Fu Y, Ji Y, Wei J, Cai X, Zhu Q. 2013. Development and validation of one-step SYBR green real-time RT-PCR for the rapid detection of newly emerged duck Tembusu virus. Avian Dis, 57:595-601, 2013.
10. Ninvilai P, Nonthabenjawan N, Limcharoen B, Tunterak W, Oraveerakul K, Banlunara W, Amonsin A, Thontiravong A. The presence of duck Tembusu virus in Thailand since 2007: A retrospective study. Transbound Emerg Dis, 65:1208–1216, 2018.
11. Platt GS, Way HJ, Bowen ET, Simpson DI, Hill M, Kamath S, Bendell PJ, Heathcote OH. Arbovirus infections in Sarawak, October 1968–February 1970 Tembusu and Sindbis virus isolations from mosquitoes. Ann Trop Med Parasitol, 69:65–71, 1975.
12. Peng SH, Su CL, Chang MC, Hu HC, Yang SL, Shu PY. Genome analysis of a novel Tembusu virus in Taiwan. Viruses, 12:567, 2020.
13. Roby JA, Setoh YX, Hall RA, Khromykh AA. Post-translational regulation and modifications of flavivirus structural proteins. J Gen Virol, 96:1551, 2015.
14. Su J, Li S, Hu X, Yu X, Wang Y, Liu P, Lu X, Zhang G, Hu X, Liu D, Li X, Su W, Lu H, Mok NS, Wang P, Wang M, Tian K, Gao GF. Duck egg-drop syndrome caused by BYD virus, a new Tembusu-related flavivirus. PLOS ONE, 6:e18106, 2011.
15. Tang Y, Diao Y, Yu C, Gao X, Ju X, Xue C, Liu X, Ge P, Qu J, Zhang D. Characterization of a

Tembusu virus isolated from naturally infected house sparrows (Passer domesticus) in Northern China. Transbound Emerg Dis, 60:152–158, 2013.

16. Thontiravong A, Ninvilai P, Tunterak W, Nonthabenjawan N, Chaiyavong S, Angkabkingkaew K, Mungkundar C, Phuengpho W, Oraveerakul K, Amonsin A. Tembusu-related flavivirus in ducks, Thailand. Emerg Infect Dis, 21:2164-2167, 2015.
17. Wang Y, Yuan X, Li Y, Yu K, Yang J, Xu H, Zhang Y, Yu K, Liao M, Qin Z. Rapid detection of newly isolated Tembusu-related flavivirus by reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification assay. Virol J, 8:553–559, 2011.
18. Yan P, Zhao Y, Zhang X, Xu D, Dai X, Teng Q, Yan L, Zhou J, Ji X, Zhang S, Liu G, Zhou Y, Kawaoka Y, Tong G, Li Z. An infectious disease of ducks caused by a newly emerged Tembusu virus strain in mainland China. Virology, 417:1–8, 2011.
19. Yu G, Lin Y, Tang Y, Diao Y. Evolution of Tembusu virus in ducks, chickens, geese, sparrows, and mosquitoes in northern China. Viruses, 10:485, 2018.
20. Yun T, Ni Z, Hua J, Ye W, Chen L, Zhang S, Zhang Y, Zhang C. Development of a one-step real-time RT-PCR assay using a minor-groove-binding probe for the detection of duck Tembusu virus. J Virol Methods 181:148-154, 2012.

Exp. Rep. VRI., No.2: 71~80 (2024)

Development of a real-time quantitative RT-PCR assay for the detection of novel Tembusu virus

YP Chen*, MC Deng

Veterinary Research Institute, Ministry of Agriculture

Abstract Since 2010, the Tembusu virus (TMUV) caused a novel disease characterized by a severe drop in egg production and neurological signs in poultry in China. Then, the disease spread to duck farms in Malaysia and Thailand. Furthermore, a variant TMUV was discovered in mosquitoes and diseased ducks in 2019 and in diseased geese in 2020 in Taiwan. In the study, we developed a one-step TaqMan-based quantitative real-time RT-PCR (RT-qPCR) to detect TMUV. The primers and probe were designed based on the NS5 gene sequences of Taiwanese TMUV and were used for the RT-qPCR to amplify a 119 bp DNA fragment. In addition, the detection limit of the RT-qPCR was 20 copies. The standard curve of RT-qPCR covered a wide dynamic range ($2x10^1$ – $2x10^{10}$ copy number of RNA) and showed a strong linear relationship, with a correlation coefficient of 0.999. Moreover, the specificity was also confirmed according to that the other important pathogens could not be detected. In addition, the TaqMan-based RT-qPCR assay successfully detected the NS5 gene in clinical samples. The newly developed RT-qPCR assay exhibited good sensitivity and specificity, which will provide technical support for the reliable and specific rapid diagnosis, and quantitative analysis of TMUV infection.

***Keywords**: Tembusu virus, Quantitative, Real-time RT-PCR, Copy number*

* Corresponding Author
Veterinary Research Institute, Ministry of Agriculture

Exp. Rep. VRI., No.2: 71~80 (2024)