羊口疮病毒实时荧光定量 PCR 检测方法的建立及初步应用

Establishment and preliminary application of real-time fluorescence quantitative PCR assay for detecting Orf virus

周曼，中国农业大学动物医学院

背景

羊口疮（Orf）又称羊接触传染性脓疱皮炎（Contagious Pustular dermatitis）。它是由羊口疮病毒（Orf virus，ORFV）引起的一种急性、非全身性、接触传染性的人兽共患病。Orf 感染在全世界绵羊和山羊养殖国家无处不在。个体或品种的遗传易感性和免疫缺陷已被怀疑是导致 ORFV 持续和发展的重要因素。近几年来，ORFV 的感染范围持续在扩大，包括人在内的多种动物均可被感染。病变在动物体上主要表现为口唇等部位形成脓疱和垢痂，导致动物采食障碍，严重者由于继发感染而死亡。

方法

通过设计一对特异针对 ORFV011 基因的特异性引物，将其扩增后连接至 pEASY-T1 载体，转化至 trans-T1 感受态细胞，构建重组质粒，并提取。以重组质粒为模板，建立 EvaGreen 实时荧光定量 PCR 检测方法，评估其特异性、灵敏性和重复性，并对临床疑似羊口疮病料组织样品以此方法进行检测。

结果

重组质粒构建成功。所建立的方法标准曲线线性关系良好，相关系数 R^2=0.999；与小反刍兽疫病毒、山羊痘病毒和流产嗜衣原体无交叉反应，该方法特异性强；它的最低检测限为 1×10^2 copies/μL，灵敏度相较于普通 PCR 方法高出 10 倍；变异系数＜2%，该方法重复性好。对于 43 份临床组织病料，利用所建立的荧光定量检测，ORFV 阳性率达到 55.8%，高于普通 PCR 方法的阳性检出率。

结论

所建立的羊口疮病毒实时荧光定量 PCR 检测方法可应用于 ORFV 的快速诊断和临床监测。