

doi:

山羊痘病毒检测方法研究进展

张莹辉, 姚文生, 康凯, 王团结, 薛麒, 吴思捷, 赵俊杰, 印春生*

(中国兽医药品监察所, 北京 100081)

[收稿日期] 2017-05-25 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2018) 03-0000-00 [中图分类号] S852.65

[摘要] 就山羊痘病毒分离鉴定、电镜观察、ELISA 试验、琼脂扩散试验、免疫荧光抗体试验、PCR 试验等检测方法进行了综述, 以期山羊痘病毒的实验室诊断提供参考。

[关键词] 山羊痘病毒; 检测方法; 研究进展

Research Progress of Detection Methods of Goat Pox Virus

ZHANG Ying-hui, YAO Wen-sheng, KANG Kai, WANG Tuan-jie,

XUE Qi, WU Si-jie, ZHAO Jun-jie, YIN Chun-sheng*

(China Institute of Veterinary Drugs Control, Beijing 100081, China)

Corresponding author: YIN Chun-sheng, E-mail: zjs62158844@sohu.com

Abstract: This paper reviews the detection methods of goat pox virus including virus isolation and identification, electron microscopy observation, ELISA test, AGAR diffusion test, immunofluorescence antibody test, PCR test, and so on, in order to provide reference for experimental diagnosis of goat pox virus.

Key words: goat pox virus; detection methods; research progress

山羊痘病毒 (goat pox virus, GTPV) 属于痘病毒科 (poxviridae) 脊椎动物痘病毒亚科 (poxvirinae) 山羊痘病毒属 (Capripoxvirus), 可感染绵阳和山羊引起恶性痘病, 包括肯尼亚绵阳痘、山羊痘、印度羊皮炎、北非绵羊和山羊的石痘等, 其中细毛羊、羔羊最易感山羊痘病毒, 病羊呈现特征性的临床表现: 发热、无毛或少毛部位皮肤黏膜发生丘疹和疱疹、淋巴结肿大、皮肤水肿、病羊消瘦、产乳量大幅度降低, 严重降低了山羊的生产性能及羊毛和羊皮制品的质量, 是所有动物痘病中最为严重的一种, 成年发病羊死亡率可高达 42.06%, 病羔羊死亡率高达

100%, 一旦发病可造成巨大经济损失^[1-3]。本病在世界许多地区已有发生, 特别是非洲北部、中东和亚洲的部分国家流行较为严重, 我国周边国家如尼泊尔、俄罗斯、印度等也均有本病流行。而我国境内的江苏、陕西、福建以及四川、云南、广西等地也有该病的发生, 主要是由于养羊业发展过程中, 品种的引进、流动引起了山羊痘的传播和流行。此病为 OIE 规定的 A 类疾病, 我国将其列为国家 I 类动物疫病^[4-6]。此外山羊痘病毒还可感染人, 重庆市彭水县发生一例具有特异性病原学诊断依据人感染羊痘病例, 其他地区还发生过几例人感染羊痘的

作者简介: 张莹辉, 本科, 从事兽用生物制品研究及实验动物管理。

通讯作者: 印春生。E-mail: zjs62158844@sohu.com

报道,所有病例均有与病羊的接触史,为接触性感染,因此山羊痘病毒检测方法的研究具有重要的公共卫生学意义^[7]。为此,就近年来山羊痘病毒检测方法研究进展进行了综述,以为其确诊提供参考。

1 病原学检测

1.1 病毒的分离鉴定 病毒的分离鉴定可采集发病羊皮肤和黏膜的痘疹和痘斑以及鼻腔分泌物、发热期血液和肺部病变组织、淋巴结等作为病料^[8]。山羊痘病毒培养多选用原代或次代羔羊睾丸细胞或羔羊肾细胞,除这两种细胞较为敏感外,犊牛睾丸细胞也具有同样的敏感性,一些分离株也可在 Vero、BHK-21 及鸡胚绒毛尿囊膜细胞上生长。

刘棋等^[9]使用疑似病羊的皮肤丘疹、水泡或脓疱组织的病毒悬液接种于初生羔羊睾丸细胞观察到明显的细胞病变:接种第 2 天大部分细胞变圆、变细,细胞浆内有可疑颗粒及空泡,感染单层细胞在 5 天内死亡;而接种于 9~10 日龄鸡胚绒毛尿囊膜,未见痘斑,传 3 代均无异常变化。切环^[10]取内蒙古病羊的皮肤痘疹和水疱作病料样品,分别接种 BHK-21 传代细胞和 10 日龄 SPF 鸡胚, BHK-21 细胞出现了明显的、规律的细胞病变:单层 BHK-21 细胞在 24 h 后开始收缩、聚集,于 48 h 后病变细胞开始拉网,出现空泡,至 72 h 细胞全部脱落死亡。接种病料样品的 10 日龄 SPF 鸡胚,在 120 h 后剖检,结果发现鸡胚胚体出血、充血,绒毛尿囊膜增厚,接种部位具有明显的痘斑。周碧君等^[11]取贵州省发生的疑似山羊痘病例山羊的皮肤疱疹和水疱作病料,接种 BHK-21 传代细胞盲传 3 代后,出现了明显的、规律的细胞病变。用该 BHK-21 细胞培养物接种 9 日龄鸡胚绒毛尿囊膜,随着传代次数的增加,痘斑病变的出现率有所上升。李有文等^[12]将某制药厂提供的山羊痘病毒毒株接种于经过三种不同处理的绵羊睾丸细胞,出现了不同的细胞病变,其中接种于原代绵羊睾丸细胞,在病变初期细胞圆缩或变长,中期成片成葡萄串装,后期为长梭细胞与葡萄串状交织相连;而接种于传代绵羊睾丸细胞,病变初期细胞变长,中期细胞交织拉网,后期细胞间质变大、脱落;接种于冻存的绵羊睾丸

细胞,细胞在病变初期变窄、变长,中期长细胞交织拉网,后期细胞间质变大、脱落。

1.2 病毒的电镜观察 周碧君等^[4]采集了贵州两个山羊痘疫区的病死羊病料,经过鸡胚绒毛尿囊膜细胞和 BHK-21 细胞培养,将培养所得材料制成切片,经硝酸铅和醋酸铅双重染色后对病毒粒子进行了观察:初期的病毒粒子呈卵圆形,大小约为 250 nm~350 nm,被膜完整或不完整,被膜内所含电子密度较高而均匀的物质所占比例大,另有电子密度中等而均匀的物质分布在电子密度较高物质的四周;中期的病毒粒子形状和大小类似于初期病毒,但电子密度高的物质所占比例较小,病毒粒子直径较小,可见致密的类核体;完全成熟的病毒粒子致密,多呈卵圆形,电子密度不均匀,大小约为 (150 nm~180 nm)×(220 nm~280 nm),中央有呈哑铃形的核酸芯髓和两个功能不清的侧小体。

2 血清学检测方法

2.1 病毒中和试验 病毒中和试验(VNT)是检测山羊痘病毒特异性较强的血清学诊断方法,但羊痘感染后主要以细胞免疫为主,感染动物仅产生低水平的中和抗体,导致病毒中和试验的敏感性不高^[13-14]。

2.2 免疫琼脂扩散实验 周碧君等^[11]将盲传 4 代后感染 BHK-21 细胞培养物反复冻融 3 次与山羊痘标准阳性血清做琼脂扩散实验,能够出现白色沉淀线,而与正常对照细胞沉淀抗原和 PBS 不出现沉淀线。王开功等^[15]采用琼脂扩散试验对患病山羊皮肤黏膜痘疹和感染细胞培养物进行检查,发现对于病毒粒子含量较高的病料,其阳性检出率亦较低,对感染细胞培养物也难以直接检出病毒抗原。

2.3 酶联免疫吸附试验 王芳等^[16]将人工合成密码子优化的 GPV p32 基因,在大肠杆菌中进行表达,以纯化的重组 p32-opti 蛋白作为 ELISA 包被抗原,建立了间接 ELISA 抗体检测方法。该 ELISA 检测方法具有良好的特异性、敏感性和重复性,可用于 GPV 感染的流行病学调查以及疫苗接种动物的抗体水平监测。

2.4 免疫荧光抗体试验 刘忠伟等^[8]使用异硫氰

酸荧光标记兔抗羊痘 IgG,并以羊痘荧光抗体检测羊痘皮肤痘疹切片和感染细胞抹片,发现了特异性黄绿色荧光。徐春志等^[17]制备了山羊痘直接荧光抗体,检测感染细胞中的山羊痘病毒抗原,可检测出 BHK-21 感染细胞中病毒抗体原,且此荧光能够被山羊痘标准阳性血清特异性抑制,用制备的荧光抗体检测感染山羊痘病毒标准弱毒株、疫苗株及分离株的 BHK-21 细胞抹片,结果均为阳性,检测正常细胞为阴性。

2.5 血凝试验 王开功等^[18]采用兔抗山羊痘病毒 IgG 致敏绵羊红细胞建立的反向间接血凝试验,对山羊痘病毒抗原具有较高特异性和敏感性,与其它动物疾病病毒抗原不发生交叉反应。对现场采集的山羊痘待检抗原的检测结果表明其敏感性比 AGP 高,该反向间接血凝试剂可应用于兽医临床诊断(血清学监测与流行病学调查)也可作为山羊痘病毒分离培养的血清学检测指标,是一种灵敏、简单、快速的诊断方法。

3 分子生物学检测方法

3.1 PCR 检测方法 PCR 又叫聚合酶链式反应,是体外酶促合成特异性 DNA 的一种方法,它能够使目的 DNA 迅速扩增,具有特异性强、灵敏度高、操作简便等特点,可用于基因分离、克隆及核酸序列分析等研究。山羊痘病毒属于双股 DNA 病毒,更适于 PCR 检测^[19]。徐春志等^[17]比较了 Trizol 法和 SDS-蛋白酶 K 法提取山羊痘病毒 DNA 后,根据山羊痘病毒 P32 基因设计了引物,建立了可用于山羊痘临床诊断的特异性强、可靠性好、灵敏度高的 PCR 方法,该方法可检测出山羊痘病毒 Y 株、贵州现场分离毒 LD 株和 QL 株的细胞感染物以及山羊痘疹样本中病毒 DNA。张志成等^[20]基于 GenBank 上发表的羊痘病毒全基因序列,设计合成了一对引物,建立了检测羊痘病毒的 PCR 方法及其试剂盒。郭巍等^[19]人基于山羊痘病毒 P32 特异性基因和 α -微管蛋白特异性基因,设计了 2 对引物,扩增到了 P32 基因与 GenBank 上收录序列同源性达到 98%,表明了该方法具有很好的特异性和准确性。

3.2 PCR-酶切检测方法 冯迎春等^[21]针对山羊

痘病毒 T3A/T3C 基因设计了 1 对特异引物,并以其 DNA 为模板进行 PCR 扩增,连接到 pMD18 载体进行序列测定,其结果与已报道的山羊痘病毒相应序列进行比对,其同源性高达 98%。同时利用产物中的特有酶切位点 EcpR V (89 位)进行进一步的酶切分析,建立了特异的 PCR/酶切检测方法,结果表明该引物特异性好,敏感性强,可应用于山羊痘病毒感染的临床诊断。

3.3 荧光定量 PCR 检测方法 荧光定量 PCR 是 20 世纪 90 年代由美国某生物公司率先推出的一种新型的核算定量技术,相比普通 PCR,它具有较强的直观性,特异性强、敏感性好、精确性高,从而被广泛用于疾病诊断、基因检测和免疫分析等领域^[22-23]。张倩等^[24]针对山羊痘病毒基因组 P32 基因设计了 1 对特异性引物,构建出稳定的标准品,来替代定量测定山羊痘疫苗半成品中的核酸。该标准品敏感性和特异性高、稳定性好,可用于山羊痘核酸的定量测定。实时荧光定量 PCR 通过在 PCR 反应体系中加入荧光基团,利用荧光信号积累实施监测 PCR 的全过程,最后建立标准曲线对模板进行定量分析^[25],是一种灵敏度高、特异性好、稳定性强的 PCR 方法,可广泛用于分子生物学和医学等领域的研究^[26]。目前在兽医领域,RQ-PCR 应用于病原体分子检测、基因表达定量分析、单核苷酸多态性及其突变分析等^[27]。安维雪等^[28]针对山羊痘病毒参考毒株 A29L 基因序列,设计了 1 对特异性引物以及 2 条 TaqMan 探针,同时制备重组质粒标准品,建立了羊痘病毒实时荧光定量 PCR 检测方法,该诊断方法与 4 种非羊痘病毒不发生交叉反应,其重复性试验变异系数均低于 2%,具有良好的特异性、灵敏性、稳定性。姚俊等^[29]针对山羊痘病毒 gp063 基因 DNA 序列,设计了 1 条 PCR 引物和 1 支 TaqMan 探针,同时制备了含有靶 DNA 序列的 PEASY-T1 重组质粒标准品,经过反应条件的优化建立了山羊痘病毒 Taqman 法实时荧光定量 PCR 检测方法,经检测该方法具有较高的灵敏性、特异性且安全、快速,适用于山羊痘病毒的早期检测。赵文华等^[30]基于小反刍兽疫病毒的 N 基因以

及山羊痘病毒的 ITR 基因,分别设计合成了 2 套特异性引物及探针,分别用 5'FAM-TAMRA3'及 5'JOE-Eclipse3'标记后建立了 N-ITR 基因的二联探针实时荧光定量 RT-PCR,该方法特异性好,敏感度高,无交叉反应,且可实现两种病毒快速同步检测。程振涛等^[31]选取了位于山羊痘病毒基因组 gp064 区域的基因片段,设计合成了 1 对 PCR 引物和一条 TaqMan-MGB 探针,建立了 PQ-PCR 和标准曲线,该方法可用于临床样本、人工感染动物试验组织以及三带喙库蚊体内山羊痘病毒的定量检测,特异性高、敏感性高、临床应用性强。

3.4 双重 PCR 检测方法 在 PCR 技术不断发展过程中,产生了多重 PCR 技术,能够一次性鉴别多种疾病,在疫病的诊断上有着非常大的优势^[32]。向智龙等^[33]基于山羊痘病毒 ITR 和羊口疮病毒 H2L 基因片段,合成两对引物,以山羊痘病毒和羊痘疮病毒的核酸混合物作为模板,建立了快速鉴别检测两种病毒的双重 PCR 方法,该方法特异性强、敏感性高、快速简便,可用于山羊痘病毒和羊口疮病毒的联合检测和鉴别诊断。肖雯等^[34]针对绵羊痘病毒(SPPV)和山羊痘病毒的基因组序列,分别设计了 2 对特异性引物,经优化条件,建立了快速鉴别检测 SPPV 和 GTPV 的双重 PCR 方法,该方法特异性试验中,未对牛疙瘩皮肤病病毒、犬细小病毒、大肠杆菌 O157、沙门氏菌等有特异性扩增,同时具有较好的灵敏度。

4 存在的问题与展望

综上所述,要防治山羊痘的发生和流行,其早期的诊断非常重要。在山羊痘病毒的检测中,琼脂扩散实验操作简便,但其敏感性不高。ELISA 方法具有较高的灵敏性和特异性,是世界卫生组织推荐的诊断方法之一。近年来我国学者研究的侧重点主要是 PCR 方法,此方法多基于 P32 基因、ITR 基因、A29L 基因、末端反向重复序列等设计引物,具有灵敏度高、特异性好、快速等优点,其中以荧光定量 PCR 方法最好,可作为实验室诊断的有效方法。但是鉴于此方法对仪器设备、实验操作人员以及实验的条件等均由有较高的要求,在检测成本有限的

情况下推广此方法有较高的难度。

参考文献:

- [1] 吴清民.兽医传染病学[M].中国农业大学出版社,2002.
Wu Q M. Veterinary infectious diseases[M]. China Agricultural University Press,2002.
- [2] 赵文华,杨仕标,高华峰,等.小反刍兽疫病毒及山羊痘病毒 N-ITR 基因二联实时荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立[J].中国畜牧兽医,2014,41(3):65-71.
Zhao W H, Yang S B, Gao H F, et al. Development of the duplex real-time RT-PCR assay with TaqMan probe of N-ITR genes for detection of peste des petits ruminants virus and goat pox virus [J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2014, 41 (3): 65-71.
- [3] 许世勇.羊痘的研究进展[J].中国畜牧兽医,2012,39(1):228-230.
Xu S Y. Research progress of pox[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2012, 39(1): 228-230.
- [4] 周碧君,虞天德,阴正兴,等.山羊痘病毒粒子的电子显微镜观察[J].中国预防兽医学报,2006,28(03):316-319.
Zhou B J, Yu T D, Yin Z X, et al. Electronic microscopic observation of virus particles of goat pox[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2006, 28(3): 316-319.
- [5] Rao T V S, Bandyopadhyay S K. A comprehensive review of goat pox and sheep pox and their diagnosis[J]. Animal Health Res Rev, 2000, 1(2): 127-136.
- [6] 许乐仁,周碧君.山羊痘的研究概况[J].内蒙古畜牧科学,2003,24(4):13-15.
Xu L R, Zhou B J. A review on study of goat pox [J]. Inner Mongolian Journal of Animal Sciences and Production, 2003, 24 (4): 13-15.
- [7] 凌华,李勤,金连梅.一起人感染羊痘病毒疫情的实验室诊断[J].中国人兽共患病学报,2012,28(5):442-444,448.
Ling H, Li Q, Jin L M, et al. Laboratory diagnosis on an outbreak of human cases infected with goatpox virus in Chongqing [J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2012, 28(5): 442-444, 448.
- [8] 刘忠伟.山羊痘病毒的血清学检测与 PCR 鉴定[D].贵州大学,2006.
Liu Z W. Serological detection and PCR identification of goat pox virus [D]. Guizhou University, 2006.
- [9] 刘棋,黄夏,郭建刚,等.山羊痘病毒的分离鉴定及生物学特性的研究[J].中国预防兽医学报,2006,28(5):494-498.

- Liu Q, Huang X G, Guo J G, *et al.* Isolation, identification and biological characteristics of goat poxvirus [J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2006, 28(5): 494-498.
- [10] 切环. 山羊痘病毒 NM 株的分离鉴定 [J]. 中国畜牧兽医, 2013(07): 179-181.
- Qie H. Isolation and identification of goat pox viruses NM strain by PCR [J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2013, 40(7): 179-181.
- [11] 周碧君, 岳 筠, 徐春志, 等. 山羊痘病毒的分离与鉴定 [J]. 中国预防兽医学报, 2007, 29(9): 661-664.
- Zhou B J, Yue J, Xu C Z, *et al.* Isolation and identification of goat poxvirus [J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2007, 29(9): 661-664.
- [12] 李有文, 魏 风, 郭志儒, 等. 山羊痘病毒培养及其细胞病变观察研究 [J]. 安徽农业科学, 2009, 37(3): 1102-1104.
- Li Y W, Wei F, Guo Z R, *et al.* Culturing of goat pox virus and observation of pathological changes of the cells [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2009, 37(3): 1102-1104.
- [13] Bhanuprakash V, Hosamanib M, Singhe R K. Prospects of control and eradication of capripox from the Indian subcontinent [J]. Antiviral Research, 2011(91): 225-232.
- [14] 颜新敏, 张 强. 山羊痘病毒免疫学研究进展 [J]. 动物医学进展, 2009, 30(12): 67-70.
- Yan X M, Zhang Q. Progress on immunology of capripoxvirus [J]. Progress in Veterinary Medicine, 2009, 30(12): 67-70.
- [15] 王开功, 虞天德, 何光志, 等. 应用反向间接血凝试验检测山羊痘病毒抗原 [J]. 山地农业生物学报, 2005, 24(1): 29-32.
- Wang K G, Yu T D, He Z G, *et al.* The detection of goat pox virus antigen by reverse passive hemagglutination [J]. Journal of Mountain Agriculture and Biology, 2005, 24(1): 29-32.
- [16] 王 芳, 雷 震, 于 力, 等. 山羊痘病毒 p32 基因原核表达及间接 ELISA 抗体检测方法的建立 [J]. 中国预防兽医学报, 2009, 31(12): 945-948.
- Wang F, Lei Z, Yu L, *et al.* Development of an indirect ELISA for detection of antibodies against goat pox virus using recombinant p32 protein as antigen [J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2009, 31(12): 945-948.
- [17] 徐春志. 山羊痘荧光抗体检测与 PCR 方法的建立 [D]. 贵州大学, 2008.
- Xu C Z. Detection of fluorescent antibody of goat pox and establishment of PCR method [D]. Guizhou University, 2008.
- [18] 王开功, 虞天德, 何光志, 等. 应用反向间接血凝试验检测山羊痘病毒抗原 [J]. 山地农业生物学报, 2005, 24(01): 29-32.
- Wang K G, Yu T D, He G Z, *et al.* The detection of goat pox virus antigen by reverse passive hemagglutination [J]. Journal of Mountain Agriculture and Biology, 2005, 24(1): 29-32.
- [19] 郭 巍, 陈 杰, 黄保续, 等. 应用 PCR 检测山羊痘病毒 [J]. 中国兽医科技, 2003, 33(12): 49-51.
- Guo W, Chen J, Huang B X, *et al.* Detection of capripoxvirus in goat skin specimen by PCR [J]. Chinese Journal of Veterinary Science and Technology, 2003, 33(12): 49-51.
- [20] 张志成, 陈丽华, 陆静静, 等. 羊痘病毒 PCR 检测方法的建立和试剂盒的研制 [J]. 中国动物检疫, 2011, 28(2): 44-46.
- Zhang Z C, Chen L [J]. H, Lu J J, *et al.* Construction of PCR for detection of capripox virus and its kit [J]. China Animal Health Inspection, 2011, 28(2): 44-46.
- [21] 冯迎春, 任玉鹏, 颜其贵, 等. 山羊痘病毒 PCR/酶切检测方法的建立 [J]. 畜牧与兽医, 2011, 43(1): 57-59.
- Feng Y C, Ren Y P, Yan Q G, *et al.* Establishment of PCR/ digestion method for goat pox virus [J]. Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2011, 43(01): 57-59.
- [22] 尹 航, 杨焕良, 陈 艳, 等. 甲型 H1N1 流感病毒实时荧光定量 PCR 检测方法的建立 [J]. 中国预防兽医学报, 2013, 35(1): 36-39.
- Yin H, Yang H L, Chen Y, *et al.* Establishment of one-step Taq-Man real time RT-PCR for Pandemic/2009 influenza viruses in swine [J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2013, 35(1): 36-39.
- [23] 赵爱兰, 孟 琼, 白向宁, 等. 双重实时荧光定量 PCR 检测产志贺毒素大肠埃希菌 stx1 和 stx2 基因 [J]. 临床检验杂志, 2013, 31(4): 241-244.
- Zhao A L, Meng Q, Bai X N, *et al.* Establishment of the duplex quantitative real-time PCR method detected the stx1 and stx2 genes of Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC) [J]. Chinese Journal of Clinical Laboratory Science, 2013, 31(4): 241-244.
- [24] 张 倩, 唐 娜, 王金良, 等. 山羊痘疫苗荧光定量效检方法的建立及应用 [J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2015, 46(06): 865-869.
- Zhang Q, Tang N, Wang J S, *et al.* Establishment and Application of fluorescent quantitation efficacy test for vaccine of goat pox virus [J]. Journal of Shandong Agricultural University (Natural Science Edition), 2015, 46(6): 865-869.
- [25] Mikael K A, Jose M A, Martin B, *et al.* The real-time polymerase chain reaction [J]. Molecular Aspects of Medicine, 2006, 27: 95-125.
- [26] 赵焕英, 包金凤. 实时荧光定量 PCR 技术的原理及其应用研究进展 [J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2007, 16(4): 492

-497.

Zhao H Y, Bao J F. Research on the principle and application of real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction[J]. Chinese Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 2007, 16(4):492-497.

[27] 薛 霜, 独军政, 高闪电, 等. 实时荧光定量 PCR 技术研究进展及其在兽医学中的应用[J]. 中国农学通报, 2010, 26(7):11-15.

Xue S, Du J Z, Gao S D, et al. Recent advances of real-time fluorescent quantitative PCR and its applications in veterinary medicine [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2010, 26(7):11-15.

[28] 安维雪, 庞方圆, 王艳杰, 等. 羊痘病毒实时荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 中国兽医学报, 2016, 36(4):572-578.

An W X, Pang F Y, Wang Y J, et al. Establishment of the real-time fluorescence quantitative PCR for detection of capripox virus [J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2016, 36(4):572-578.

[29] 姚 俊, 段国军, 陈官国, 等. 山羊痘病毒 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立及应用[J]. 山地农业生物学报, 2012, 31(5):412-419.

Yao J, Duan G J, Chen G G, et al. Development and application of TaqMan real-time PCR for the quantitative detection of goatpox virus[J]. Journal of Mountain Agriculture and Biology, 2012, 31(5):412-419.

[30] 赵文华, 杨仕标, 高华峰, 等. 小反刍兽疫病毒及山羊痘病毒 N-ITR 基因二联实时荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立[J]. 中国畜牧兽医, 2014, 41(3):65-71.

Zhao W H, Yang S B, Gao H F, et al. Development of the duplex real-time RT-PCR assay with TaqMan probe of N-ITR genes

for detection of peste des petits ruminants virus and goat pox virus [J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2014, 41(3):65-71.

[31] 程振涛, 岳 筠, 李永明, 等. 山羊痘病毒 TaqMan-MGB 荧光定量 PCR 检测方法的建立与应用[J]. 生物工程学报, 2009, 25(3):464-472.

Cheng Z T, Yue J, Li Y M, et al. Development and application of TaqMan-MGB real-time quantitative PCR assay for detection of goat pox virus [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2009, 25(3):464-472.

[32] 刘海成. 动物疫病诊断中多重 PCR 技术的应用[J]. 中国畜禽种业, 2015, (8):32-33.

Liu H C. Application of multiplex PCR in diagnosis of animal disease[J]. The Chinese Livestock and Poultry Breeding, 2015, (8):32-33.

[33] 向智龙, 程振涛, 卓建华, 等. 山羊痘病毒和羊口疮病毒双重 PCR 检测方法的建立与初步应用[J]. 中国畜牧兽医, 2011, 38(1):88-91.

Xiang Z L, Cheng Z T, Zhuo J H, et al. Establishment and rudiment application of duplex PCR for goatpox virus and orf virus [J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2011, 38(1):88-91.

[34] 肖 雯, 聂福平, 王 昱, 等. 绵羊痘病毒和山羊痘病毒双重 PCR 检测方法的建立及应用[J]. 中国预防兽医学报, 2012, 34(7):551-554.

Xiao W, Nie F P, Wang Y, et al. Differentiation of sheeppox virus and goatpox virus by duplex PCR[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2012, 34(7):551-554.

(编辑:李文平)