

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2024.06.09

羊口疮实验室检测方法研究进展

张嘉雯,周祉玉,朱真,杜吉革,莘若兰,王诗研,陈小云*

(中国兽医药品监察所(农业农村部兽药评审中心),北京 100081)

[收稿日期] 2024-01-18 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2024) 06-0072-07 [中图分类号] S858.26

[摘要] 羊口疮是由羊口疮病毒(Orf Virus, ORFV)引起的嗜上皮性人畜共患传染病。该病在国内均有流行,对养羊业造成了巨大的经济损失。快速高效的检测方法对羊口疮的防治至关重要,目前常用的羊口疮实验室检测方法包括病毒分离鉴定、病毒中和试验(VNT)、酶联免疫吸附实验(ELISA)、免疫荧光试验(IFA)、琼脂扩散试验(ATD)、蛋白质印迹法(WB)、侧流免疫层析测定法(LFIA)、聚合酶链式反应(PCR)、实时荧光定量 PCR(qPCR)等。本文概述了 ORFV 实验室检测方法的研究进展,为快速、准确的诊断 ORFV 提供依据。

[关键词] 羊传染性脓疱皮炎;人畜共患病;实验室检测方法

Research Progress on Laboratory Detection Methods for ORF

ZHANG Jia-wen, ZHOU Zhi-yu, ZHU Zhen, DU Ji-ge, XIN Ruo-lan, WANG Shi-yan, CHEN Xiao-yun*

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

Corresponding author: CHEN Xiao-yun, E-mail: caucxy@163.com

Abstract: Orf is an epitheliophilic zoonotic infectious disease caused by the sheep infectious pustular dermatitis virus (ORFV). This disease is prevalent both domestically and internationally, causing huge economic losses to the sheep farming industry. Therefore, fast and efficient detection methods play a crucial role in the prevention and treatment of orf. The commonly used laboratory detection methods for orf include virus isolation and identification, virus neutralization assay (VNT), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), immunofluorescence assay (IFA), agar diffusion assay (ATD), Western blotting (WB), side flow immunoassay (LFIA), polymerase chain reaction (PCR), real-time fluorescence quantitative PCR (qPCR), etc. This article provides an overview of the research progress on laboratory detection methods for ORFV, providing a basis for rapid and accurate diagnosis of ORFV.

Key words: CE; zoonotic disease; laboratory testing methods

基金项目:草食家畜新发和重要疫病新型疫苗研究(2023YFD1802501)

作者简介:张嘉雯,硕士研究生,从事兽医生物制品方面的研究。

通讯作者:陈小云。E-mail: caucxy@163.com

羊口疮 (Orf) 又称羊传染性脓疱皮炎 (Contagious ecthyma, CE), 属于痘病毒科, 副痘病毒属, 是由羊口疮病毒 (Orf virus, ORFV) 引起的一种嗜上皮性、高度接触性人畜共患病^[1]。该病毒为双链 DNA 病毒, 大约长 138 kb, 其病毒粒子主要为圆形或椭圆形, 病毒表面衣壳蛋白呈管状、丝状排列, 外面还有一层囊膜^[2]。其临床特征主要是在唇部、口腔黏膜、鼻孔周围及乳房等处的皮肤黏膜上形成丘疹、水疱、脓疱及疣状结痂^[3]。ORFV 不仅会影响小反刍动物的产奶量, 还会严重影响动物的进食, 造成动物消瘦、衰弱, 甚至会导致动物的死亡^[4]。该病主要感染 3~6 月羔羊, 发病率高, 病死率低, 但容易反复感染, 这与羊口疮的免疫逃避机制有关。感染了羊口疮的动物更容易继发感染葡萄球菌等病菌, 这增加了感染羊的致死率, 给我国养羊业造成了巨大的经济损失^[5]。因此快速有效的羊口疮检测方法对该病的防控十分重要。目前常见的方法有临床诊断方法、实验室诊断方法。临床诊断方法有一定的局限性, 只能做初步判断, 无法确诊; 实验室诊断方法为兽医提供更加精准的疾病诊断依据, 更有效的防控疾病的发生。实验室诊断方法包括病毒分离鉴定、血清学检测方法、分子生物学检测方法。其中血清学检测方法包括病毒中和试验 (VNT)、酶联免疫吸附实验 (ELISA)、免疫荧光试验 (IFA)、免疫组化试验 (IHC)、琼脂扩散试验 (ATD)、蛋白质印迹法 (WB)、侧流免疫层析测定法 (LFIA)。分子生物学检测方法有聚合酶链式反应 (PCR)、实时荧光定量 PCR (qPCR)、等温扩增方法如环介导 (LAMP) 技术等。本文概述了 ORFV 最新实验室检测方法的研究进展。

1 病毒分离鉴定

原代细胞中羔羊睾丸细胞和肾细胞是最常用的 ORFV 分离细胞, 除此之外胎牛肌细胞、胎羊真皮细胞、牛睾丸细胞、胎牛肺细胞、胎羊肾细胞、胎羊肌细胞、羊胚胎鼻甲细胞、牛肾细胞和非洲绿猴肾细胞也可用于病毒分离。将采集临床症状明显病羊口唇部位的痂皮制成组织匀浆接种到羊胚胎鼻甲细胞 (OFTu) 培养物中。在细胞培养物中观察

到细胞病变效应 (CPE), 反复冻融离心取上清液, 经磷钨酸溶液负染后电镜观察。可以在电镜下观察到呈卵圆形线团样, 病毒粒子外由双层被膜包裹, 由此可以做判断^[6]。王勇等将病毒液接入牛肾细胞 (MDBK) 中进行分离, 出现明显病变进行鉴定^[7]。Maan 等在将病毒悬液接入非洲绿猴肾细胞 (Vero) 中进行分离, 并已在 PCR 和测序中使用 GIF/IL-2 和 B2L 基因特异性引物进行鉴定^[8]。该检测方法准确可靠, 但由于病毒分离耗时久, 步骤繁琐, 对实验设备和实验人员要求高, 不适于普遍推广。

2 血清学方法

2.1 病毒中和试验 病毒中和试验是评价中和抗体阻止病毒抗原进入细胞能力的参考。然而, 诊断 ORFV 通常不用中和试验, 因为机体感染 ORFV 主要引起细胞免疫应答, 激活多种免疫细胞, 诱导产生多种细胞因子, 但机体产生的中和抗体浓度较低, 病毒中和试验极易漏检^[9]。李宏等利用病毒中和试验证明单克隆抗体 4E1 具有中和病毒的作用, 为早期诊断羊口疮提供了可能^[10]。

2.2 酶联免疫吸附试验 酶联免疫吸附实验是将抗原或抗体结合在固相载体表面, 利用抗原抗体的特异性结合以及抗体或者抗原上标记的酶催化特定底物发生显色反应, 实现目标物检测的免疫分析方法^[11]。ELISA 可以同时检测大量样品, 操作简单、灵敏度高、特异性强, 对试验设备和操作人员要求不高, 可普遍推广。目前, 国内外通常建立间接 ELISA 主要针对 F1L 和 B2L 两个蛋白。Revanaiah 等建立并优化了基于 rF1L 的间接 ELISA 方法^[12]。该检测方法检测感染其他病原 (山羊痘病毒、羊痘病毒、小反刍兽疫病毒、口蹄疫病毒和蓝舌病病毒) 的血清无交叉反应, 尽管抗体水平低, 但该方法诊断特异性为 94.04%, 敏感性为 89.22%, 检测效率高于病毒中和试验。张静等截断表达 B2L 蛋白, 建立并优化了基于 B2L 的间接 ELISA 方法^[13]。该检测方法较大的应用价值在于包被物获得简单, 阴阳性血清分辨晰以及检测效率高。

2.3 免疫荧光试验 免疫荧光利用荧光标记的抗

体作为探针对组织或细胞内特定抗原进行定位和定性分析。由于其具有特异性强、敏感性高、速度快等优势,是常用的临床检测方法之一^[14]。宁梦夏等建立了羊口疮病毒单抗定位检测细胞培养物中 ORFV 的间接免疫荧光方法,ORFV 感染的牛睾丸上皮细胞呈绿色^[15]。该方法补充了间接 ELISA、PCR 等方法无法对感染 ORFV 组织细胞中的抗原进行定位,对于病毒理化性质等深入研究具有重要的价值。Zhou 等在 ORFV B2L 蛋白多克隆抗体的制备及应用中,通过间接免疫荧光法证实其特异性和抗原性^[16]。

2.4 免疫组化 免疫组织化学是通过化学反应使标记抗体显色来确定组织细胞内抗原,提供组织抗原的直接可视化,也是应用最广泛的蛋白质检测技术之一。Fleming 等利用免疫组织化学验证缺失 CBP 蛋白的 ORFV 是否在绵羊皮肤内复制^[17]。观察 ORFV 在机体内病理变化以及检测 ORFV 在皮肤的动态分布,具有放大信号效应,为进一步了解 ORFV112 基因缺失株诱导绵羊产生免疫机制的研究提供科学依据,同时为疫苗的研发提供数据支持。向益等从感染 ORFV 的金堂黑山羊中选取病变明显的口唇等部位制成石蜡切片,HE 染色后镜下可观察到,明显的棘层肥厚,有炎性细胞浸润^[18]。该试验只在口唇部位发现病毒粒子,这可能与病毒侵袭力有关,推进了羊口疮致病机理的研究。Muhsen 等利用 ORFV 在三维人皮肤模型中的感染,阐明了 ORFV 感染的表皮和真皮防御机制以及 ICAM-1 相关免疫逃避机制,推进了人感染 ORFV 的致病机理的研究^[19]。

2.5 琼脂扩散试验 琼脂扩散为可溶性抗原与抗体在琼脂凝胶中所呈现的一种沉淀反应。鲜思美等利用兔抗羊口疮高免血清进行琼脂扩散试验检测羊口疮病毒,特异性高,不与山羊痘病毒(GPV)、口蹄疫病毒(FMDV)抗原发生交叉反应^[20]。该方法是适用于基层养殖业检测的血清学方法,具有重要的应用价值。但感染羊出现高浓度抗体需要时间,容易出现假阴性的结果。因此推荐与其他检测方法结合检测,减小误诊。

2.6 蛋白质印迹(WB) 蛋白质印迹是分子生物学和蛋白质组学中最常用的技术之一。由于蛋白质印迹方法实验步骤多,导致再现性差以及效率低。目前已开发很多新方法改善这些不足有所,例如单细胞分辨蛋白质印迹、毛细管电泳、自动微流体蛋白质印迹和微芯片电泳等^[21]。Czerny 等利用兔抗 ORFV 多克隆血清做 WB,分析结果显示相对分子质量为 39 kDa 和 22 kDa 的 2 个蛋白主要作为单克隆抗体的靶点,有助于了解鉴定免疫优势抗原位点,为后续病毒与宿主相互作用的分子基础提供了数据^[22]。

2.7 侧流免疫层析测定法 侧流免疫层析测定法是一种经典的基于抗原抗体免疫反应的检测手段。该检测方法操作简单快捷,但检测结果依赖于人工判读,会造成一定的误差。Zhao 等使用两种不同的针对 ORFV ORF011 蛋白的单克隆抗体开发了一种快速简单的侧流免疫层析测定法,用于特异性检测 ORFV 病毒^[23]。LFIA 测试的相对特异性和敏感性分别为 100% 和 92.1%,该方法测试性能稳定,可用于 ORFV 感染现场快速检测。

3 分子生物学方法

3.1 聚合酶链式反应 羊口疮保守区域中的 F1L 和 B2L 基因,保守性强,目前根据 F1L 和 B2L 基因设计引物,建立的不同的 PCR 方法得到了广泛的应用。Mondal 等利用 B2L 高度保守区,建立了半巢式 PCR 方法,能够检出低拷贝病毒粒子^[24],对临床样本中副痘病毒的诊断效率更高。Shehata 等通过靶向 B2L 基因内高度保守序列设计引物建立 PCR,确定是否感染 ORFV^[25]。除了单重 PCR 外,大量的多重 PCR 也被建立用于 PCR 检测,多重 PCR 能同时对多种疾病快速检测和鉴别,对疾病防控有着一定的应用价值。李琛等建立了诊断山羊痘、绵羊痘、羊口疮和小反刍兽疫多重 PCR 检测方法,对羊口疮病毒的检测限为 0.8 ng^[26]。该方法可以弥补无法用血清学方法区分这几种病毒的缺陷,特异性高,可以缩短检测时间,降低养殖户的经济损失。于远光等建立了诊断羊口疮病毒(ORFV)、牛病毒性腹泻病毒(BVDV-1)、口蹄疫病毒

(FMDV)、蓝舌病病毒(BTV)多重 PCR 检测方法,在检测病原具时有良好的特异性^[27]。

3.2 荧光实时定量 PCR qPCR 是将荧光基因或荧光染料加入 PCR 扩增反应中,利用荧光信号的变化,对 PCR 扩增中每循环扩增物质的变化进行实时检测,并进行定量分析的检测方法^[28]。qPCR 常用的有两种方法:SYBR Green 法和 TaqMan 探针法。与传统的基于凝胶的 PCR 相比,定量 PCR 对病毒核酸检测的灵敏度是常规 PCR 的 10 ~ 100 倍且无需后续实验处理,可作为实验室检测的首选方法。冯星等建立检测 ORFV 的实时荧光定量 PCR 方法,以荧光嵌合染料 SYBR Green I 为荧光基因,并针对 ORFV F1L 基因的高度保守区设计了特异性引物,该方法与其他常见 DNA 病毒无交叉反应,SYBR Green I 染料的这种颜色检测方法具有与琼脂糖凝胶电泳相同的灵敏度,这将有助于在不使用琼脂糖凝胶电泳的情况下在现场条件下对样品进行大规模的初步筛选和对 ORFV 感染的快速诊断^[29]。多重实时荧光定量 PCR 可以对小拷贝数目标进行定量,可以识别临床上的混合感染,这对于布署适当的控制措施是至关重要的。但多重实时荧光定量 PCR 受很多因素影响,很容易出现假阴性的结果。Venkatesan 等设计两种不同的引物和探针对基于 TaqMan 探针的双重实时荧光定量 PCR 进行了优化,对 ORFV 和羊痘病毒(CaPv)进行检测定量^[30]。该双重检测方法可以替代相应的实时荧光定量 PCR 方法同时对 CaPv 和 ORFV 进行敏感和特异性检测,并对这些靶标进行定量。双重实时荧光定量 PCR 的分析灵敏度表明,该方法可同时检测 20 个拷贝的 CaPv 和 ORFV 单独和混合 DNA,且具有高度的特异性,与早先报道的其他痘病毒无交叉反应。勾倩倩等建立能同时检测蓝舌病毒(BTV)、小反刍兽疫病毒(PPRV)、羊口疮病毒(ORFV)、羊痘病毒(CaPv)的多重实时荧光定量 PCR 方法,通过选择荧光强度高且干扰较小的荧光报告基因,实现了在单管内同时检测 BTV、PPRV、ORFV、CaPv,极大缩短了检测周期^[31]。

3.3 环介导等温扩散 环介导等温扩散是在由

Notomi 等于 2000 年首次报道的一种新的等温核酸扩增法^[32]。该方法主要在 60 ~ 65 °C 下等温条件下进行核酸扩增,通过肉眼观察反应体系的颜色和沉淀等变化判定结果。检测过程中不需携带大量仪器,操作简便,适合基层临床检测。王海峰等建立羊口疮病毒环介导等温扩增高效检测方法,根据羊口疮病毒的 VIR 基因序列设计 2 对引物,通过电泳法和染色法对羊口疮病毒的检出率高达 100%,比普通 PCR 灵敏性高 1000 倍^[33]。Venkatesan 等使用羟基萘酚蓝(HNB)和钙黄绿素作为预加染料,以封闭管形式优化了基于 B2L 基因的 LAMP 测定,可以在一小时内揭示结果的优化分析具有高度特异性和敏感性^[34]。Wang 等建立了关于 F1L 基因的等温扩散方法,用于 ORFV 感染的特异性检测,并将该方法的有效性与时 PCR 进行了比较,结果表明 LAMP 的灵敏度略低于实时 PCR。然而,实时 PCR 需要昂贵的实验设备,因此,这种基于 LAMP 的检测方法与实时 PCR 相比具有明显的实用性优势,可以在任何标准诊断实验室中使用^[35]。

3.4 重组酶聚合酶扩增 Wang 成功地建立了一种用于 ORFV 快速检测的重组酶辅助扩增测定法。ORFV 检测的分析灵敏度高,与其他常见 DNA 病毒的无交叉反应^[36]。Yang 等将等温重组酶聚合酶扩增技术与侧流免疫测定条结合(ORFV - RPA - LFD 测定),建立一种快速视觉检测 ORFV 的分子扩增测定法。该检测方法能够在不到 25 min 的时间内检测到 ORFV,极大缩短了检验时间^[37]。Cui 等建立了一种无 DNA 提取、实时、可视化的重组酶辅助扩增方法,用于 ORFV 的快速检测^[38]。与 PCR 相比,该检测方法无需提取 DNA 步骤,操作简单,结果直观,能够满足现场快速检测和基层实验室的需要,对患病动物的早期诊断具有重要的参考价值和意义。

3.5 测序和系统发育分析 测序并应用生物信息学工具分析数据,有助于追踪病毒进化和传播中更精细的细节。Ahanger 等对 B2L 和 VIR 基因序列全长测序,鉴定 Orf 病毒。基于 VIR 基因的系统发育分析表明,ORFV 毒株之间存在宿主特异性的遗

传同质性,进行系统发育分析,确定克什米尔喜马拉雅山脉流行的 ORFV 毒株与已发表的参考序列的系统发育关系,为进一步研究克什米尔喜马拉雅山地区 ORFV 及其综合防控提供了资料^[39]。Peralta 等从阿根廷报道第一例感染羊口疮人类的痂皮中分离病毒,系统发育分析表明该分离株来自同一个阿根廷省报道的羊口疮病例。增加了对在该地区传播的 ORFV 的了解,可以警示接触易感动物的人类做好防护措施,减小感染 ORFV 的可能性^[40]。

4 存在的问题及展望

羊口疮在全球范围内均有流行,是目前严重危害养羊业的重要疫病之一。由于羊口疮可以在动物之间来回传播,并感染人类,加之治疗羊口疮并没有特效药,因此找到快速、准确、简单、有效的检测方法非常重要,能及时发现和防控羊口疮的传播,减少养殖户的经济损失。

目前已经有多种检测羊口疮的实验室检测方法,这些实验室检测方法各有优劣。例如病毒分离鉴定可以区分与羊口疮临床症状相似的疾病例如山羊痘,但其耗时长且对实验条件和实验人员技能具有较高要求,很难在基层检测中广泛使用。由于羊口疮病毒的特性,病毒中和试验极易漏检。酶联免疫吸附实验检测 ORFV 目前主要针对 F1L 和 B2L 两个蛋白,与羊痘病毒、口蹄疫病毒等常见病的血清无交叉反应,操作简单、灵敏性高,可普遍推广。免疫荧光试验可以实现细胞中的 ORFV 定位,免疫组化试验能在组织中的检测 ORFV 包括动态分布以及病理变化,两者都极大推动羊口疮致病机理的研究。蛋白质印迹法更利于了解 ORFV 中的免疫优势抗原位点,但再现性较差且效率较低。聚合酶链式反应以及实时荧光定量 PCR 目前主要针对保守序列 F1L 等设计引物,能检测 ORFV 感染,多重 PCR 和多重实时荧光定量 PCR 能够同时对羊常见的多种病原进行快速检测,缩短了检测时间,节约检测成本。环介导等温扩增方法操作简单方便,满足现场快速检测,但对引物设计要求高。随着人们对羊口疮不断的了解研究,ORFV 快速检测的未来主要着重于开发先进的、标准化的试剂盒,

在保证灵敏性和准确性的同时,降低对外界条件的要求,提高检测效率,防范羊口疮传播的风险,更好的适应未来养殖、检测等行业的需求。

参考文献:

- [1] Wang R, Mo J, Luo X, *et al.* ORFV infection enhances CXCL16 secretion and causes oncolysis of lung cancer cells through immunogenic apoptosis. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022 Jul 25; 12:910466.
- [2] 刘清铃. 羊传染性脓疱的诊断与防治[J]. 福建畜牧兽医, 2018, 40(1): 45-46.
Liu Q L. Diagnosis and prevention of infectious pustules in sheep [J]. *Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine Fujian*, 2018, 40(1): 45-46
- [3] Bergqvist C, Kurban M, Abbas O. Orf virus infection. *Rev Med Virol.* 2017 Jul;27(4).
- [4] Yu Y Z, Wu Z J, Zhu Z B, *et al.* [Molecular characteristics and immune evasion strategies of ORFV: a review]. *Bing Du Xue Bao.* 2012 May;28(3):278-84.
- [5] Abu Ghazaleh R, Al-Sawalhe M, Abu Odeh I, El Ibrahim J, Al-Turman B, Makhameh J. Host range, severity and trans boundary transmission of Orf virus (ORFV). *Infect Genet Evol.* 2023 Aug;112:105448.
- [6] 鲜思美, 李鹏飞, 李婷, 等. 羊口疮病毒感染 MDBK 细胞的电子显微镜观察[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2018(01): 151-153+254.
Xian S M, Li P F, Li T, *et al.* Electron microscopy observation of MDBK cells infected with sheep oral ulcer virus [J]. *Heilongjiang Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2018(01): 151-153+254
- [7] 王勇, 殷冬冬, 杨侃侃, 等. 羊口疮病毒的分离鉴定及其遗传进化分析[J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版), 2017, 38(02): 10-14.
Wang Y, Yin D D, Yang K K, *et al.* Isolation, identification, and genetic evolution analysis of sheep mouth sore virus [J]. *Journal of Yangzhou University (Agriculture and Life Sciences Edition)*, 2017, 38(02): 10-14
- [8] Maan S, Kumar A, Batra K, *et al.* Isolation and molecular characterization of contagious pustular dermatitis virus from Rajasthan, India. *Virusdisease.* 2014;25(3):376-80.
- [9] 龙琴琴, 魏敏, 王雨婷, 等. 羊口疮病毒与宿主的博弈: 免疫应答与病毒免疫逃逸机制[J]. 畜牧兽医学报, 2023, 54(05): 1845-1853.

- L Q Q, W M, Wang Y T, *et al.* The Game between Sheep Mouth Ulcer Virus and Host: Immune Response and Virus Immune Escape Mechanisms [J]. Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences, 2023, 54 (05): 1845 - 1853
- [10] 李宏. 羊口疮病毒 ORFV086 基因编码病毒颗粒结构蛋白的遗传和免疫学特性的鉴定[D]. 南方医科大学, 2013.
- Li H. Identification of genetic and immunological characteristics of the ORFV086 gene encoding the viral particle structure protein of sheep mouth sore virus [D]. Southern Medical University, 2013
- [11] Tabatabaei MS, Ahmed M. Enzyme - Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Methods Mol Biol. 2022;2508:115 - 134.
- [12] Yogisharadhya R, Kumar A, Bhanuprakash V, Shivachandra SB. Evaluation of a recombinant major envelope protein (F1L) based indirect - ELISA for sero - diagnosis of orf in sheep and goats. J Virol Methods. 2018 Nov;261:112 - 120.
- [13] 张静. 截短表达 B2L 蛋白及羊口疮病毒间接 ELISA 方法的建立[D]. 内蒙古农业大学, 2020.
- Zhang J. Establishment of an indirect ELISA method for truncated expression of B2L protein and sheep mouth sore virus [D]. Inner Mongolia Agricultural University, 2020
- [14] 宁梦夏, 程红玉, 马文涛, 等. 羊口疮病毒间接免疫荧光检测方法的建立[J]. 动物医学进展, 2020, 41 (04): 42 - 47.
- Ning M X, Cheng H Y, Ma W T, *et al.* Establishment of an indirect immunofluorescence detection method for sheep mouth sore virus [J]. Progress in Animal Medicine, 2020, 41 (04): 42 - 47
- [15] 宁梦夏. 用于间接免疫荧光检测的羊口疮病毒单抗杂交瘤细胞的筛选与鉴定[D]. 西北农林科技大学, 2019.
- Ning M X, Screening and identification of hybridoma cells using monoclonal antibodies against sheep mouth sore virus for indirect immunofluorescence detection [D]. Northwest A&F University, 2019
- [16] Zhou Q, Gu X, Xu Z, Huang R, Huang J, Li H, Li T, Zhou X, Su G, Yin D, Wang G. [Preparation and application of anti - envelope protein B2L mouse polyclonal antibody of ORF virus]. Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi. 2018 Nov;34 (11):1036 - 1040. Chinese.
- [17] Fleming S B, McCaughan C, Lateef Z, *et al.* Deletion of the Chemokine Binding Protein Gene from the Parapoxvirus Orf Virus Reduces Virulence and Pathogenesis in Sheep. Front Microbiol. 2017 Jan 24;8:46.
- [18] 向益, 豆朋朋, 王利, 等. 金堂黑山羊传染性脓疱的病理组织学观察和病毒分子检测[J]. 中国兽医杂志, 2022, 58 (03): 37 - 41.
- Xiang Y, Dou P O, Wang L *et al.* Pathological observation and viral molecular detection of infectious pustules in Jintang Black Mountain sheep [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2022, 58 (03): 37 - 41
- [19] Muhsen M, Protschka M, Schneider L E, Müller U, Köhler G, Magin TM, Büttner M, Alber G, Siegemund S. Orf virus (ORFV) infection in a three - dimensional human skin model: Characteristic cellular alterations and interference with keratinocyte differentiation. PLoS One. 2019 Jan 30; 14 (1):e0210504.
- [20] 鲜思美, 吴健, 杨钰, 等. 琼脂扩散试验检测羊口疮病毒[J]. 中国兽医杂志, 2014, 50 (08): 23 - 25.
- Xian S M, Wu J, Yang Y, *et al.* Detection of Sheep Mouth Ulcer Virus by Agar Diffusion Test [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2014, 50 (08): 23 - 25
- [21] Mishra M, Tiwari S, Gomes AV. Protein purification and analysis: next generation Western blotting techniques. Expert Rev Proteomics. 2017 Nov;14 (11):1037 - 1053.
- [22] Czerny CP, Waldmann R, Scheubeck T. Identification of three distinct antigenic sites in parapoxviruses. Arch Virol. 1997;142 (4):807 - 21.
- [23] Zhao K, He W, Bi J, *et al.* Development of a lateral flow immunochromatographic assay for the rapid diagnosis of Orf virus infections. J Virol Methods. 2016 Oct;236:10 - 17.
- [24] Mondal B, Bera A K, Hosamani M, Tembhumne PA, Bandyopadhyay SK. Detection of Orf virus from an outbreak in goats and its genetic relation with other parapoxviruses. Vet Res Commun. 2006 Jul;30(5):531 - 9.
- [25] Shehata A A, Elsheikh H A, Abd - Elfatah E B. Molecular detection and characterization of Orf virus from goats in Egypt. Open Vet J. 2022 Mar - Apr;12(2):273 - 280.
- [26] 李琛. 鉴别诊断山羊痘、绵羊痘、羊口疮和小反刍兽疫多重 PCR 检测方法的建立[D]. 内蒙古农业大学, 2015.
- Li C. Establishment of a multiplex PCR detection method for differential diagnosis of goat pox, sheep pox, sheep mouth ulcer, and small ruminant disease [D]. Inner Mongolia Agricultural University, 2015
- [27] 于远光, 岳涛, 马晓宁, 等. 鉴别感染羊驼 4 种病毒多重 PCR 检测方法的建立[J]. 中国兽医科学, 2023, 53 (09): 1102 - 1107.
- Yu Y G, Yue T, Ma X N, *et al.* Establishment of a multiplex PCR detection method for identifying four viruses infecting alpacas [J]. Chinese Veterinary Science, 2023, 53 (09): 1102 - 1107

- [28] Forootan A, Sjöback R, Björkman J, Sjögreen B, Linz L, Kubista M. Methods to determine limit of detection and limit of quantification in quantitative real - time PCR (qPCR). *Biomol Detect Quantif*. 2017 Apr 29;12:1 - 6.
- [29] Venkatesan G, Balamurugan V, Bhanuprakash V. TaqMan based real - time duplex PCR for simultaneous detection and quantitation of capripox and orf virus genomes in clinical samples. *J Virol Methods*. 2014 Jun;201:44 - 50.
- [30] 冯星, 卢昌杨, 邓亚飞, 等. 羊口疮病毒 SYBR Green I qPCR 方法建立及 VIR 基因的遗传演化分析[J]. *中国人兽共患病学报*, 2023, 39(08): 772 - 779.
- Feng X, Lu C Y, Deng Y F, *et al*. Establishment of SYBR Green I qPCR method for sheep mouth sore virus and genetic evolution analysis of VIR gene [J]. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2023, 39 (08): 772 - 779
- [31] 勾倩倩, 杜吉革, 朱真, 等. 蓝舌病病毒小反刍兽疫病毒羊口疮病毒和山羊痘病毒多重荧光定量 PCR 检测方法的建立与应用[J]. *中国兽医科学*, 2022, 52(12): 1510 - 1517.
- Gou Q Q, Du J G, Zhu Z, *et al*. Establishment and application of a multiplex fluorescence quantitative PCR detection method for blue tongue disease virus, ruminant disease virus, sheep mouth sore virus, and goat pox virus [J]. *Chinese Veterinary Science*, 2022, 52 (12): 1510 - 1517
- [32] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, *et al*. Loop - mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*. 2000 Jun 15;28(12):E63.
- [33] 王海峰. 羊口疮病毒环介导等温扩增高效检测方法的建立 [D]. 内蒙古农业大学, 2018.
- Wang H F. Establishment of an efficient detection method for sheep mouth sore virus mediated isothermal amplification [D]. Inner Mongolia Agricultural University, 2018
- [34] Venkatesan G, Kushwaha A, Kumar A, *et al*. An improved visual closed tube Loop mediated isothermal amplification (LAMP) assay for rapid identification of orf virus in sheep and goats. *Vet Ital*. 2022 Dec 30;58(2).
- [35] Wang G, Shang Y, Wang Y, *et al*. Comparison of a loop - mediated isothermal amplification for orf virus with quantitative real - time PCR. *Virol J*. 2013 May 1;10:138.
- [36] Wang Y, Cui Y, Yu Z, *et al*. Development of a recombinase - aided amplification assay for detection of orf virus. *J Virol Methods*. 2020 Jun;280:113861.
- [37] Yang Y, Qin X, Wang G, *et al*. Development of an isothermal amplification - based assay for rapid visual detection of an Orf virus. *Virol J*. 2016 Mar 19;13:46.
- [38] Cui H, Guan J, Lu H, *et al*. Rapid Onsite Visual Detection of Orf Virus Using a Recombinase - Aided Amplification Assay. *Life (Basel)*. 2023 Feb 10;13(2):494.
- [39] Ahanger S A, Parveen R, Nazki S, *et al*. Detection and phylogenetic analysis of Orf virus in Kashmir Himalayas. *Virusdisease*. 2018 Sep;29(3):405 - 410.
- [40] Peralta A, Flores - Olivares C, Verna A, *et al*. Identification and molecular characterization of Orf virus infection in occupationally exposed women in South America. *Rev Argent Microbiol*. 2023 Apr - Jun;55(2):129 - 132.

(编辑:侯向辉)