

PCR技术在口蹄疫实验室检测中的问题及对策研究

黎艳珊

广州市白云区动物卫生监督所

DOI:10.32629/as.v9i2.3726

[摘要] 口蹄疫作为全球范围内严重危害偶蹄动物健康的烈性传染病,其快速、精准的实验室诊断是有效防控疫情的关键前提。聚合酶链式反应(PCR)技术凭借其高灵敏度与特异性,已成为口蹄疫病毒检测的核心分子生物学手段。该技术在实验室中的规范应用,对于及时确认病原、鉴定血清型、追溯疫情来源以及评估疫苗免疫效果具有不可替代的作用。

[关键词] PCR技术; 口蹄疫实验室检测中的问题及对策研究

中图分类号: O6-31 **文献标识码:** A

Research on the Problems and Countermeasures of PCR Technology in Laboratory Detection of Foot-and-Mouth Disease

Yanshan Li

Animal Health Supervision Institute of Baiyun District

[Abstract] Foot-and-mouth disease (FMD), a highly contagious and severe infectious disease that seriously endangers the health of even-toed ungulates worldwide, requires rapid and accurate laboratory diagnosis as a key prerequisite for effective prevention and control of the epidemic. Polymerase chain reaction (PCR) technology, with its high sensitivity and specificity, has become a core molecular biological method for FMD virus detection. The standardized application of this technology in laboratories plays an irreplaceable role in timely identification of the pathogen, determination of serotypes, tracing the source of the epidemic, and evaluation of vaccine immunization effects.

[Key words] PCR technology; Problems and countermeasures in FMD laboratory detection research

引言

随着分子生物学技术的飞速发展,以PCR及其衍生技术为代表的核酸检测方法,极大地革新了动物疫病的诊断模式。在口蹄疫的防控体系中,PCR技术能够从复杂的临床样本中直接检测出病毒的核酸片段,实现了对感染早期的快速诊断和病毒载量的精确定量。系统梳理和优化该技术在口蹄疫诊断全流程中的应用环节,是保障检测结果准确可靠、支撑科学决策的坚实基础。

1 PCR技术在口蹄疫实验室检测的概述

1.1 技术原理概述

聚合酶链式反应技术是一种在体外模拟DNA自然复制过程的核酸扩增技术,其核心原理依赖于热循环和酶促反应。通过高温使双链DNA模板变性解链为单链。在适当降温条件下,设计合成的特异性引物与单链DNA模板上的互补序列结合。在耐热DNA聚合酶的催化下,以dNTPs为原料,沿模板合成新的DNA互补链。经过多次重复这一变性、退火、延伸的循环过程,目标DNA片段得以指数级扩增,从而能够被后续方法灵敏检测。

1.2 检测流程介绍

口蹄疫PCR检测流程主要涵盖样本处理、核酸提取、PCR扩增与结果分析四个阶段。对采集的疑似病料进行适当预处理。采用适宜的核酸提取方法,如商业化试剂盒法,从样本中纯化出病毒RNA。利用反转录酶将RNA反转录为互补DNA,以此作为PCR扩增的模板。在含有特异性引物、聚合酶、dNTPs及缓冲体系的反应管中进行PCR循环扩增。扩增结束后,通过琼脂糖凝胶电泳、实时荧光检测或毛细管电泳等方法,对扩增产物进行分析,依据是否产生特异性条带或荧光信号来判断样本中是否存在口蹄疫病毒核酸。

1.3 检测效果评估

PCR技术应用于口蹄疫检测的效果主要体现在其灵敏性与特异性上。灵敏度指该方法能够检测出极低拷贝数病毒核酸的能力,使得在感染早期或病毒载量极低的情况下仍可实现有效检出。特异性则指设计的引物能够准确识别并扩增口蹄疫病毒的目标核酸序列,而与其他病原体或背景核酸发生交叉反应的可能性极低。检测效果的评估还需考量其重复性与稳定性,即在

同一实验室或不同实验室内,对同一标准样本进行多次检测,结果应保持一致可靠。

2 PCR技术在口蹄疫实验室检测中存在的问题

2.1 样本处理难题

口蹄疫临床样本来源多样,包括水疱液、组织、血清等,其质量与状态直接影响后续核酸提取效率与纯度。样本若保存不当、发生腐败或反复冻融,会导致病毒核酸降解。样本中存在的复杂成分,如血红蛋白、脂肪、多糖或抑制剂,若未在提取过程中有效去除,会干扰后续的酶促反应,显著降低PCR扩增效率,甚至导致完全抑制,造成假阴性结果。

2.2 引物设计缺陷

引物设计的质量是PCR特异性和效率的决定性因素。若引物序列与靶标区域匹配度不高,或存在二聚体、发夹结构等自身互补,会严重影响其与模板的结合效率。引物特异性不足,可能与非目标序列发生结合,导致非特异性扩增,产生杂带或背景信号。引物设计未充分考虑口蹄疫病毒不同血清型或毒株间的序列变异,可能导致对某些流行毒株的检测灵敏度下降或漏检。

2.3 假阳性结果问题

假阳性结果的产生主要源于扩增产物的污染。既往PCR扩增产物气溶胶化,是实验室环境中最常见的污染源。阳性对照品的泄露、样本间的交叉污染,或试剂、耗材被外源核酸污染,均可能导致非目标样本中出现特异性扩增信号。假阳性结果会严重误导疫情判断,引发不必要的防控行动,造成资源浪费和社会恐慌。

2.4 仪器设备限制

PCR检测依赖于精密的温控设备。热循环仪孔间温度不均一性或温度控制精度不足,会导致不同反应管扩增效率存在差异,影响结果的重复性与可比性。用于结果分析的设备,如电泳系统或荧光检测仪,若性能不稳定或校准不当,会影响对扩增产物条带大小或荧光信号强弱的准确判读,从而可能产生错误结论。

2.5 操作人员能力不足

PCR实验流程包含多个精细操作环节,对操作人员的专业素养和规范性要求高。人员若对实验原理解释不深,或未严格遵守标准操作规程,在样本处理、试剂配制、加样、污染防控等环节容易引入误差。对结果的分析与判读需要一定的经验与专业知识,能力不足可能导致对弱阳性、非特异性条带或异常扩增曲线的误判,直接影响检测报告的准确性。

3 PCR技术在口蹄疫实验室检测中问题的对策

3.1 优化样本处理方法

针对不同来源和类型的临床样本,例如疱液、组织或口腔拭子,标准化并优化其前处理流程。通过严格规范样本采集部位、工具和保存液,确保病毒核酸初始载量不受损失并抑制降解。在核酸提取步骤,综合考虑裂解效率与纯度,选用或优化裂解液配方与结合条件,旨在充分释放病毒RNA的同时最大化去除样本中的PCR抑制剂,如血红素、多糖或蛋白质。需对提取后的核酸进行纯度与浓度评估,必要时引入浓缩或纯化步骤以提升模板质

量。整个处理过程应在独立的物理空间内进行,严格区分清洁区与污染区,并采用一次性耗材与负压抽吸装置,以杜绝样本间的交叉污染。通过实施从采样至核酸获得的全链条标准化操作,为后续PCR扩增提供高质量的起始模板,从而提升检测灵敏度与可重复性,为结果的可靠性奠定坚实基础。

3.2 改进引物设计方案

基于最新、最全面的病毒基因组数据库及流行毒株监测数据,选取病毒基因组中高度保守且功能关键的序列区域作为靶标,如5'非翻译区或结构蛋白VP1基因的保守区段。在设计过程中,需借助专业生物信息学软件进行多序列比对分析,以精准避开可能形成二级结构或引物二聚体的区域,同时严格评估其Tm值、GC含量及3'端稳定性。为进一步提高检测覆盖能力,可探索并验证多重引物组的设计与应用,实现对多种血清型或基因型的同时检测。引物合成后必须经过严格的实验室验证,包括特异性验证、灵敏度测试以及与近缘病原体的交叉反应性评估。建立完善的引物性能监控与更新机制,确保引物序列能及时跟进病毒变异情况,从而保障检测方法的精确性与广泛适用性,有效应对病毒进化带来的挑战。

3.3 降低假阳性措施

建立并严格执行一套完善的防污染操作规范与实验室分区管理方案。整个PCR流程需物理分隔为独立的四个区域:试剂准备区、样本制备区、核酸扩增区及产物分析区,各区之间执行单向 workflow,严禁人员、物品及空气逆向流动。所有操作均须在配有高效空气过滤器的生物安全柜或超净工作台内进行。实验全程应使用带滤芯的吸头,并对工作台面、仪器及设备进行定期且有效的清洁与去核酸污染处理,可采用适当的化学去污剂或紫外线照射。在试剂配制方面,建议小剂量分装,并设立阴性对照以监控试剂与环境的污染情况。针对既往扩增产物的潜在污染,可采用UNG酶处理或使用dUTP替代dTTP的预混合酶系统,在扩增前选择性降解含尿嘧啶的遗留产物。通过以上多重屏障与实时监控体系的构建,可从空间、操作与环境三个层面系统性地杜绝非特异性扩增产物的生成,最大限度保障检测结果的真实性。

3.4 升级仪器设备配置

仪器性能的优化与前沿设备的引入是提升口蹄疫PCR检测通量、自动化水平与数据质量的根本保障。在核酸提取环节,应逐步将手动提取方法升级为自动化程度高的磁珠法或膜吸附法提取工作站,这类仪器能够标准化操作流程,减少人工误差,并显著提高单次处理的样本量。对于核酸检测的核心设备,实时荧光定量PCR仪的升级至关重要,应选用具备更高光学灵敏度、更宽动态检测范围以及更精准温控模块的新一代仪器,以确保对低浓度靶标的有效识别与准确定量。为满足高通量筛查与快速诊断需求,实验室可酌情配置一体化、闭环检测的快速PCR系统或微流控芯片平台。与之配套的辅助设备亦需同步升级,包括高精度加样器、多通道移液器及恒温金属浴,所有设备均需纳入严格的定期校准与性能验证程序。建立覆盖核心与辅助设备的全生命周期管理档案,并构建设备间的信息化互联与数据自动采

集系统,以实现检测过程的智能化监控与可溯源管理,为检测结果的精确度与效率提供坚实的硬件支撑。

3.5加强人员培训管理

培训体系应涵盖理论和实践操作两个层面。理论部分需系统讲授口蹄疫的病原学特征、分子检测原理、生物安全规范及实验室质量管理体系等基础与前沿知识。实践操作则需聚焦于关键技能,包括样品的正确接收与处理、核酸提取的精确定量操作、PCR试剂配制与加样的防污染技巧、各类检测仪器的规范化使用与日常维护,以及结果的准确判读与报告解读。培训形式可采用理论授课、操作演练、模拟考核与现场带教相结合的模式。建立人员资格认证制度,所有操作人员需经考核合格后方可持证上岗,并规定岗位权限。在此基础上,实施持续的专业能力评估与再培训计划,周期性组织技能考核与理论更新课程。

4 结束语

综上所述,PCR技术作为口蹄疫实验室诊断的有力工具,其价值的充分发挥依赖于对技术原理的深刻理解、操作流程的严格规范以及应用环境的持续优化。面对疫病防控的长期挑战,持续关注并完善以PCR为核心的检测技术体系,是筑牢动物防疫屏障、保障养殖业健康稳定发展的必然要求。

[参考文献]

- [1]张月美.提高口蹄疫ELISA检测试剂盒检测通量的实验方法[J].山东畜牧兽医,2025,46(08):48-49.
- [2]许志国.不同厂家猪口蹄疫疫苗的免疫效果对比实验[J].畜牧业环境,2025,(14):107-108.
- [3]李静雯.O型口蹄疫病毒L蛋白第177位氨基酸突变对病毒毒力的影响[D].河南农业大学,2025.
- [4]张常锁,曹剑,陈君,等.口蹄疫血清抗体阴性实验牛筛选方法的探讨[J].中国动物保健,2024,26(02):116-118.
- [5]熊易帆.基于CRISPR/Cas12a动物疫病的核酸检测新方法[D].重庆大学,2023.
- [6]王志丹.BHK-21悬浮细胞克隆株筛选及口蹄疫O型蚀斑病毒制备[D].内蒙古农业大学,2023.
- [7]张敏. β -丙内酯灭活口蹄疫病毒的研究[D].内蒙古农业大学,2023.

作者简介:

黎艳珊(1983--),女,汉族,本科,广东省广州人,本科广州市白云区动物卫生监督所,助理兽医师,从事动物疫病检疫检验。