

基于重组酶聚合酶扩增结合测流层析试纸条的猪细小病毒核酸快速检测方法的建立

杨芹¹, 邱雨楼^{1,2*}, 孙凯^{1,2}, 宋斯怡¹, 董文怡¹, 刘皖皖¹, 叶子弘^{1,2*}, 俞晓平^{1,2}

1 中国计量大学 生命科学学院, 浙江 杭州 310018

2 国家市场监督管理总局重点实验室(微生物计量检测与生物制品质量安全), 浙江 杭州 310018

杨芹, 邱雨楼, 孙凯, 宋斯怡, 董文怡, 刘皖皖, 叶子弘, 俞晓平. 基于重组酶聚合酶扩增结合测流层析试纸条的猪细小病毒核酸快速检测方法的建立[J]. 微生物学通报, 2026, 53(1): 550-559.

YANG Qin, QIU Yulou, SUN Kai, SONG Siyi, DONG Wenyi, LIU Wanwan, YE Zihong, YU Xiaoping. Establishment of a rapid nucleic acid detection method for porcine parvovirus based on recombinant enzyme polymerase amplification-lateral flow dipstick (RPA-LFD)[J]. Microbiology China, 2026, 53(1): 550-559.

摘要:【背景】猪细小病毒(porcine parvovirus, PPV)是危害猪群生殖健康的重要病原之一, 给养猪业带来重大经济损失, 对猪源性产品的质量安全造成严重威胁。【目的】建立一种重组酶聚合酶扩增(recombinase polymerase amplification, RPA)结合侧流层析试纸条(lateral flow dipstick, LFD)方法, 用于PPV核酸的快速、灵敏检测。【方法】针对PPV的NS1基因保守序列设计特异性RPA引物, 通过反应条件优化建立了PPV的RPA-LFD检测方法。【结果】该方法在39 °C条件下20 min内即可完成检测, 最低检测限为10 copies/ μ L; 与猪圆环病毒2型、猪伪狂犬病毒、猪瘟病毒、猪蓝耳病毒、口蹄疫病毒等无交叉反应; 人工污染猪组织样品和模拟临床样品检测结果表明, 该方法与常规PCR方法的检测结果一致。【结论】本研究建立的RPA-LFD方法不依赖热循环仪, 操作简单、灵敏度高、特异性强, 为PPV核酸的现场快速检测提供了技术手段。

关键词: 猪细小病毒; 重组酶聚合酶扩增; 侧流层析试纸条

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFF0600800)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFF0600800).

*Corresponding authors. E-mail: QIU Yulou, yulou@cjlu.edu.cn; YE Zihong, zhye@cjlu.edu.cn

Received: 2025-04-24; Accepted: 2025-06-28; Published online: 2025-07-18

Establishment of a rapid nucleic acid detection method for porcine parvovirus based on recombinant enzyme polymerase amplification-lateral flow dipstick (RPA-LFD)

YANG Qin¹, QIU Yulou^{1,2*}, SUN Kai^{1,2}, SONG Siyi¹, DONG Wenyi¹, LIU Wanwan¹, YE Zihong^{1,2*}, YU Xiaoping^{1,2}

1 College of Life Sciences, China Jiliang University, Hangzhou 310018, Zhejiang, China

2 Key Laboratory of Microbiological Metrology, Measurement & Bio-product Quality Security, State Administration for Market Regulation, Hangzhou 310018, Zhejiang, China

Abstract: [Background] Porcine parvovirus (PPV) is one of the major pathogens threatening the reproductive health of swine herds, causing tremendous economic losses to the pig farming industry and posing a serious threat to the quality and safety of porcine products. **[Objective]** To establish a rapid and sensitive detection method for PPV nucleic acid based on recombinase polymerase amplification (RPA) combined with lateral flow dipstick (LFD) assay. **[Methods]** We designed specific primer pairs based on the conserved sequences of the NS1 gene in PPV. Then, we developed a RPA-LFD method for the detection of PPV by optimizing the reaction conditions. **[Results]** The RPA-LFD method can detect PPV nucleic acid within 20 min at 39 °C, with a limit of detection of 10 copies/ μ L. The experimental results showed that only PPV was positively detected by this method, whereas no cross reaction with porcine circovirus type 2, pseudorabies virus, swine fever virus, porcine reproductive and respiratory syndrome virus or foot-and-mouth disease virus was observed. In addition, the porcine tissue samples artificially polluted with PPV and the simulated clinical samples were detected by RPA-LFD and traditional PCR, and the results of the two methods were consistent. **[Conclusion]** The developed RPA-LFD method does not rely on a thermal cycler and it is simple to operate and highly sensitive and specific, providing an effective strategy for the *on-site* rapid detection of PPV nucleic acid.

Keywords: porcine parvovirus; recombinase polymerase amplification; lateral flow dipstick

猪细小病毒(porcine parvovirus, PPV)是引起母猪死胎、木乃伊胎、胚胎死亡和不孕综合征(stillbirth, mummification, embryonic death, and infertility, SMEDI)的主要病原体之一^[1]。PPV属于细小病毒科,是一种无囊膜的单链DNA病毒,其基因组大小约为4.0–6.3 kb,包含2个主要的开放阅读框(open reading frame, ORF)。其中,ORF1编码非结构蛋白NS1、NS2和NS3,ORF2编码结构蛋白VP1和VP2^[2]。PPV于1965年在德国首次分离自细胞培养污染物^[3],于1983年

在国内首次分离和鉴定^[4]。PPV传染性极强,既可以通过胎盘垂直传播给仔猪,又可以通过水平传播污染猪场器具、饲料和水源^[5-6]。我国养猪场PPV感染率高达90%以上,而且常与猪瘟病毒、猪圆环病毒2型、猪伪狂犬病毒和猪繁殖与呼吸综合征病毒等混合感染^[7-13]。PPV的流行不仅对养猪业造成了重大经济损失,对猪源性产品的质量安全产生严重影响,同时对人体健康造成潜在威胁。因此,建立一种快速、准确、灵敏的PPV检测方法显得至关重要。

PPV 的检测方法主要有病毒分离鉴定、PCR 方法和荧光定量 PCR 方法等。病毒分离鉴定是动物病毒检测的经典诊断方法, 但该方法对实验室环境要求严格、耗时较长、操作烦琐、成功率低, 多用于科研而非临床诊断^[14-16]。随着分子生物学的发展, PCR 和荧光定量 PCR 等分子检测方法已广泛应用于 PPV 核酸的检测。李原野等^[17]建立了一种同时检测 PPV 与猪圆环病毒 3 型 (porcine circovirus 3, PCV3) 的双重 PCR 方法, 该方法检测的最低拷贝数为 3.12×10^5 copies/ μL 。杨奕等^[18]开发了一种检测 PPV 的实时荧光定量 PCR 方法, 较常规 PCR 方法更加灵敏, 最低可检测 8.76×10^1 copies/ μL 的 PPV VP2 基因标准品。虽然传统核酸检测技术重复性好、准确性高, 但需要专业的仪器设备和操作人员, 而且检测时间长, 无法满足现场快速检测的需求。

重组酶聚合酶扩增 (recombinant enzyme polymerase amplification, RPA) 是一种简单且快速的恒温扩增技术。2006 年, Piepenburg 等^[19]

基于参与细胞 DNA 合成的蛋白重组和修复原理, 开发了 RPA 技术。与传统 PCR 方法不同, RPA 不依赖热循环仪, 仅需在 $35-43$ °C 的恒定温度下反应 15-25 min 即可实现目标基因片段的扩增, 具有快速简便、灵敏度高、特异性好等优点^[20-23]。RPA 的扩增产物可以通过多种方法进行检测, 例如琼脂糖凝胶电泳、基于探针的实时荧光定量和侧流层析试纸条 (lateral flow dipstick, LFD)^[24]。其中, LFD 无须借助仪器, 通过肉眼观察试纸条上检测线 (T 线) 和质控线 (C 线) 的颜色即可直观判读结果。将 RPA 与 LFD 相结合的 RPA-LFD 的检测原理如图 1 所示, 重组酶 (recombinase) 与特异性引物结合形成酶-引物复合物, 该复合物能够识别并结合双链 DNA 的靶序列区域, 形成局部单链结构 (D-loop); 单链 DNA 结合 (single-stranded DNA-binding, SSB) 蛋白立即结合暴露的 DNA 单链, 防止 DNA 链复性; 随后链置换 DNA 聚合酶结合引物的 3' 端并启动 DNA 链的延伸, 该过程在恒温

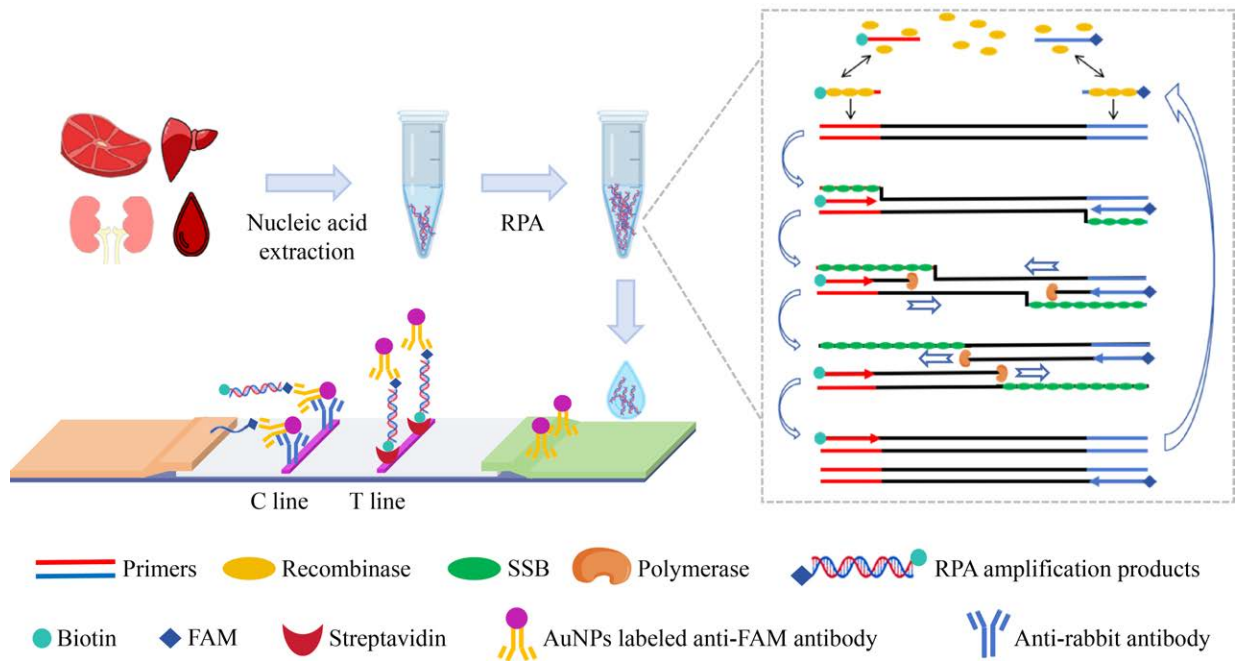


图 1 重组酶聚合酶扩增结合测流层析试纸条检测原理示意图

Figure 1 Schematic diagram of the recombinant enzyme polymerase amplification-lateral flow dipstick (RPA-LFD).

条件下循环进行, 目标序列以指数级扩增。将带有 FAM 和 biotin 双标记的扩增产物滴加至 LFD, 先与样品垫上的胶体金标记抗 FAM 抗体 (AuNPs labeled anti-FAM antibody) 结合形成复合物; 通过毛细作用力, 该复合物层析到 T 线时, 被固定在 T 线的链霉亲和素捕获, 形成肉眼可见的紫色条带; 未被捕获的复合物继续层析至 C 线, 被种属特异性抗体 (anti-rabbit antibody) 捕获, 形成紫色条带。RPA-LFD 无须依赖专业仪器、操作简便、检测时间短, 在目标核酸的现场快速检测中展现出独特优势。

本研究以 PPV 的 NS1 基因为靶标, 设计特异性引物进行 RPA 扩增, 结合 LFD 对扩增产物进行可视化检测, 以期建立一种针对 PPV 核酸的 RPA-LFD 方法, 为 PPV 核酸的快速检测提供技术手段。

1 材料与方法

1.1 样品

PPV 疫苗、猪圆环病毒 2 型 (porcine circovirus 2, PCV2) 疫苗、猪伪狂犬病毒 (pseudorabies virus, PRV) 疫苗、猪蓝耳病毒 (porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV) 疫苗、猪瘟疫病毒 (classical swine fever virus, CFSV) 疫苗、猪口蹄疫病毒 (foot-and-mouth disease virus, FMDV) 疫苗均由中牧实业股份有限公司提供。本研究的标准质粒 pUC57-NS1 是根据 NCBI 中公布的 PPV (NC-001718.1) 基因序列, 选取 NS1 基因保守片段连接至 pUC57 载体,

由金斯瑞生物科技有限公司合成。

1.2 主要试剂和仪器

TwistAmp[®] Basic Kit, TwistDx 公司; 病毒基因组 DNA/RNA 提取试剂盒, 天根生化科技 (北京) 有限公司; PrimeScript[™] RT reagent Kit, 宝生物工程 (大连) 有限公司; Milenia GenLine HybriDetect, Milenia Biotec 公司; DL2000 DNA marker (100–2 000 bp), 浙江泰坦科技股份有限公司; 琼脂糖, 杭州牧舟生物科技有限公司; TBE, 康为世纪科技股份有限公司; DNA 上样缓冲液, 生工生物工程 (上海) 股份有限公司。PCR 仪、电泳仪, Bio-Rad 公司。

1.3 引物的设计与筛选

从 NCBI 数据库下载 PPV 的基因序列 (登录号: NC-001718.1), 利用 NCBI BLAST 工具进行基因序列的比对分析, 选取 NS1 基因的保守区域, 使用 Primer 5.0 软件设计 3 对用于 PPV 检测的特异性 RPA 引物 (表 1)。为了在试纸条上获得可视化结果, 分别在上游引物的 5' 端标记 Biotin, 下游引物的 5' 端标记 FAM。引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成与标记。采用设计的引物, 按照 TwistAmp[®] Basic Kit 说明书配制反应体系: 反应缓冲液 29.5 μ L, 上、下游引物 (10 μ mol/L) 各 1.5 μ L, 阳性标准质粒 1 μ L, MgOAc 溶液 (280 nmol/L) 2.5 μ L, 无菌去离子水补足 50 μ L。在 39 $^{\circ}$ C 恒温水浴锅中反应 20 min, 扩增产物使用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

表 1 重组酶聚合酶扩增引物

Table 1 Recombinant enzyme polymerase amplification primers

Primer name	Primer sequence (5'→3')
SN1-F1	Biotin-AAGTTAGAATAGGATGCGAGGAAAGACCA
SN1-F2	Biotin-AGGAGAGACCAGAGCATACACAACCAATA
SN1-F3	Biotin-AAAGTTAGAATAGGATGCGAGGATAGACCA
SN1-R1	FAM-TCAGGTACATTTCCCAATGATGCATATA
SN1-R2	FAM-TTCAGTTTCTTCTAAAAGTCCAAAATCACC
SN1-R3	FAM-TTTTCGGACCAATCAGATACATTTCCCAAA

1.4 RPA-LFD 条件的优化

为了提高目标基因的扩增效率,对 RPA 的反应温度和反应时间进行优化。RPA 反应体系分别在 35–43 °C 扩增 20 min,通过观察试纸条检测线的颜色确定最佳反应温度。在最佳反应温度的基础上,将反应时间分别设置为 5、10、15、20、25 min,依据试纸条的检测结果确定最佳反应时间。

1.5 RPA-LFD 灵敏度和特异性试验

将 PPV 标准质粒进行 10 倍梯度稀释 (10^4 – 10^0 copies/ μ L),分别作为模板在已优化的反应条件下进行 RPA-LFD 检测,同时以无菌水作为阴性对照,确定 RPA-LFD 方法的检测限。采用病毒基因组 DNA/RNA 提取试剂盒对病毒疫苗进行核酸提取与纯化,提取的基因组 DNA 置于 -20 °C 保存备用;另将提取的 PRRSV、CSFV 和 FMDV 基因组 RNA 经 PrimeScript™ RT reagent Kit 反转录试剂盒转化为 cDNA,保存于 -20 °C 备用。分别使用 PPV 标准质粒,PPV、PCV2、PRV 的 DNA,以及 PRRSV、FMDV、CSFV 的 cDNA 为模板进行特异性试验,根据胶体金试纸条检测结果评价 RPA-LFD 方法的特异性。

1.6 人工污染样品的检测

从杭州某市场购买猪肉、猪肾、猪肝、猪血样品,用常规 PCR 方法^[25]鉴定所有样品中均不含待测病毒,使用不同浓度的标准质粒对样品进行污染,使样品最终污染浓度为 5×10^4 – 5×10^1 copies/mL。参考离心柱法病毒基因组 DNA 提取试剂盒说明书和高温快速核酸提取方法,在 4 mL 样品匀浆中加入等量裂解液,孵育 15 min 后加入无水乙醇,将液体分次转移到离心柱里于 8 000 r/min 离心 1 min 后弃废液,洗涤 3 次后加 20 μ L 无菌水溶解得到样品基因组 DNA 浓缩液,从中取 1 μ L 进行 RPA-LFD 检测。

1.7 模拟临床样品的检测

从杭州某市场购买 26 份临床猪源性样品随机混入 PPV 疫苗 5 份作为模拟临床样品,采用本研究所建立的 RPA-LFD 方法和常规 PCR 方法分别对 26 份模拟临床样品进行检测,比较 2 种方法的一致性。

2 结果与分析

2.1 RPA 引物的筛选

分别使用 3 对引物进行 RPA 扩增,阳性对照以 10^3 copies/ μ L 的 PPV 标准质粒作为模板,阴性对照以无菌去离子水作为模板,通过琼脂糖凝胶电泳对扩增产物进行分析。结果如图 2 所示,3 对引物均能成功扩增出目标条带,但不同引物对的扩增效果不同;其中 SN1-F2/R2 引物对的扩增产物条带清晰明亮,并且对照组中未出现非特异性条带,特异性良好,因此选择 SN1-F2/R2 引物对作为最佳 RPA 引物。

2.2 RPA-LFD 反应条件的优化结果

2.2.1 RPA-LFD 最佳反应温度

以 SN1-F2/R2 为引物,以 10^3 copies/ μ L PPV 标准质粒为模板配制 RPA 反应体系,对 RPA-LFD 的反应温度(35–43 °C)进行优化。实验结果如图 3

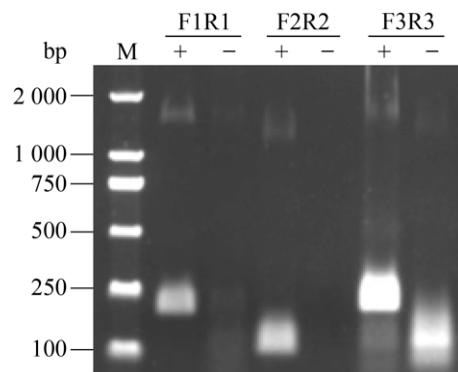


图 2 重组酶聚合酶扩增引物的筛选 M:DL2000 DNA marker; +: 阳性对照; -: 阴性对照。

Figure 2 Screening the recombinant enzyme polymerase amplification (RPA) primers. M: DL2000 DNA marker; +: Positive control; -: Negative control.

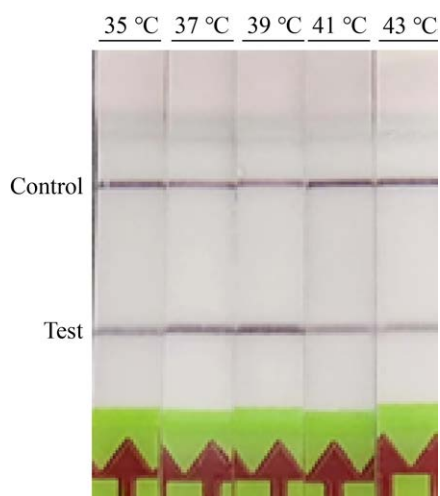


图 3 重组酶聚合酶扩增结合测流层析试纸条反应温度的优化

Figure 3 Optimization of RPA-LFD reaction temperature.

所示, RPA-LFD 在 35–43 °C 均能检测到阳性信号, 当温度在 39 °C 时试纸条上检测线颜色最深, 扩增效果最好, 当温度超过 39 °C 时检测线颜色变浅, 扩增效果减弱。因此, 确定 39 °C 为 RPA-LFD 的最佳反应温度。

2.2.2 RPA-LFD 最佳反应时间

在最佳反应温度下, 对 RPA 的反应时间 (5–25 min) 进行优化, 结果如图 4 所示, 反应时间在 5–15 min 时信号强度随着时间的增加而逐渐增强, 从 15 min 开始信号强度达到峰值且往后未明显增强。为了加快检测速度, 在保障试纸条信号强度的同时, 应尽量减少 RPA 反应时间, 因此确定 RPA 扩增的最佳时间为 15 min。

2.3 RPA-LFD 灵敏度和特异性试验结果

2.3.1 RPA-LFD 灵敏度

将 PPV 标准质粒 10 倍梯度稀释为 10^4 – 10^0 copies/ μ L 作为模板进行 RPA-LFD 灵敏度检测, 实验结果如图 5 所示, RPA-LFD 的检测限可达 10^1 copies/ μ L。

2.3.2 RPA-LFD 特异性

分别使用 PPV 标准质粒、PPV、PCV2、PRV、PRRSV、CSFV 和 FMDV 核酸作为模板对所建立的 RPA-LFD 方法进行特异性评估。实

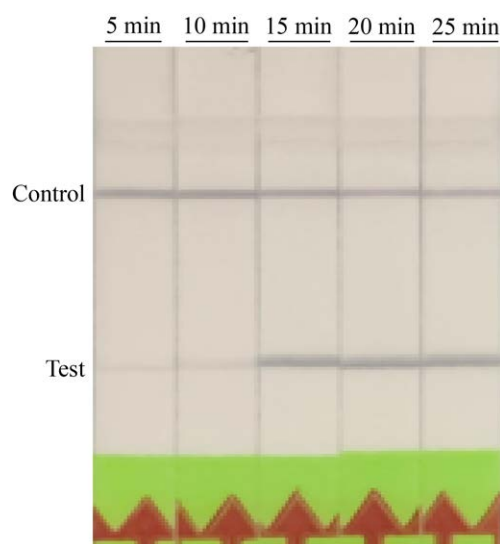


图 4 重组酶聚合酶扩增结合测流层析试纸条反应时间的优化

Figure 4 Optimization of recombinant enzyme polymerase amplification-lateral flow dipstick (RPA-LFD) reaction time.

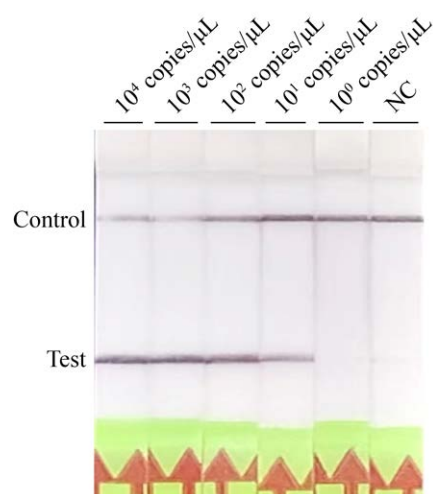


图 5 重组酶聚合酶扩增结合测流层析试纸条灵敏度 NC: 阴性对照。

Figure 5 Sensitivity test of the recombinant enzyme polymerase amplification-lateral flow dipstick (RPA-LFD). NC: Negative control.

验结果如图 6 所示, 以 PPV 标准质粒和 PPV 核酸为模板的实验组呈现阳性反应, 而其他病原检测结果均为阴性, 表明所建立的 RPA-LFD 检测方法具有良好的特异性。

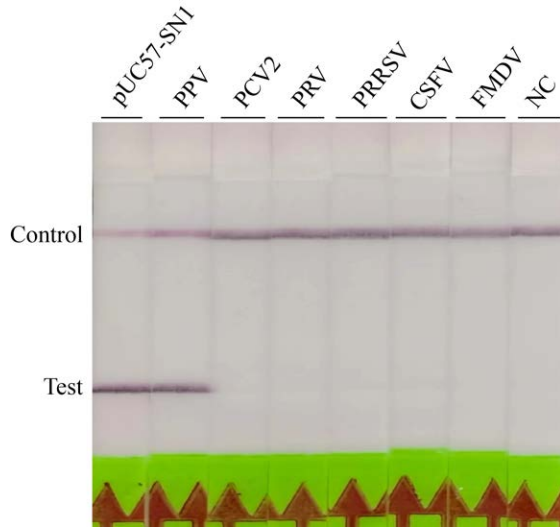


图 6 重组酶聚合酶扩增结合测流层析试纸条方法的特异性 NC: 阴性对照。

Figure 6 Specificity of the recombinant enzyme polymerase amplification-lateral flow dipstick (RPA-LFD). NC: Negative control.

2.3.3 人工污染样品的检测结果

为评估所建立 RPA-LFD 方法在实际样品中检测的准确性, 分别对不同污染浓度

(5×10^4 – 5×10^1 copies/mL)的猪肉、猪肾、猪肝、猪血样品进行 RPA-LFD 方法和常规 PCR 检测, 结果如图 7 和图 8 所示, 污染浓度为 5×10^4 copies/mL 和 5×10^3 copies/mL 的 4 种样品均被检测为阳性, RPA-LFD 方法和常规 PCR 的检测结果相一致。对于污染浓度为 5×10^2 copies/mL 和 5×10^1 copies/mL 的 4 种样品, RPA-LFD 方法的检测结果为阳性, 而常规 PCR 检测结果为阴性, 这可能是由于 PCR 检测灵敏度低而表现为假阴性。实验结果表明, RPA-LFD 方法检测人工污染样品的检测限为 5×10^1 copies/mL, 比常规 PCR 的灵敏度高 100 倍。

2.3.4 模拟临床样品的检测结果

利用建立的 RPA-LFD 方法对 26 份模拟临床样品进行 PPV 核酸检测, 同时与常规 PCR 方法进行对照分析, 结果如表 2 所示, RPA-LFD 方法检出阴性样品 21 份, 阳性样品 5 份, 该结果与常规 PCR 检测结果一致。

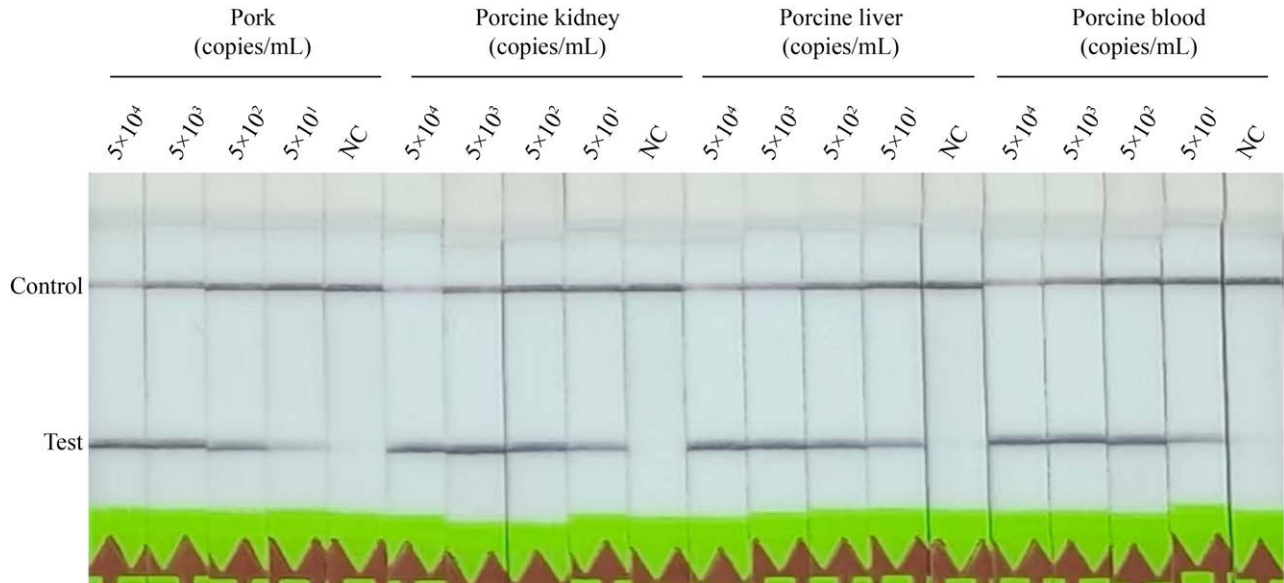


图 7 重组酶聚合酶扩增结合测流层析试纸条方法检测人工污染样品 NC: 阴性对照。

Figure 7 Detection of artificially contaminated samples by recombinant enzyme polymerase amplification-lateral flow dipstick (RPA-LFD). NC: Negative control.

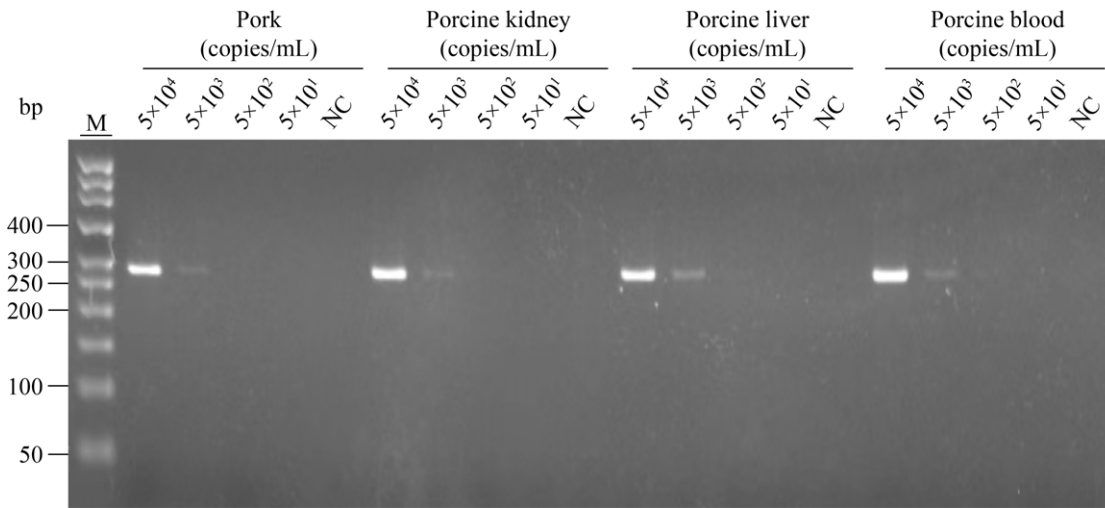


图 8 PCR 方法检测人工污染样品 M: DL2000 DNA marker; NC: 阴性对照。

Figure 8 Detection of artificially contaminated samples by PCR. M: DL2000 DNA marker; NC: Negative control.

表 2 重组酶聚合酶扩增结合测流层析试纸条和 PCR 对模拟临床样品的检测结果

Table 2 Comparison of the results of recombinant enzyme polymerase amplification-lateral flow dipstick (RPA-LFD) and PCR for simulated clinical samples

Detection method		PCR		
		Positive	Negative	Total
RPA-LFD	Positive	5	0	5
	Negative	0	21	21
	Total	5	21	26

3 讨论

近年来, RPA 技术在病原微生物检测方面的应用愈加广泛。Liu 等^[26]利用 RPA 结合 PfAgo 蛋白建立了一种鹅细小病毒快速检测方法, 39 °C 孵育 25 min 即可完成检测, 最低检测限为 3.89×10^2 copies/ μ L。Hou 等^[27]以副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) *toxR* 基因的保守区作为检测靶点, 建立了一种检测副溶血性弧菌的 RPA-CRISPR/Cas13a-LFD 方法, 最低检测限为 1 copies/ μ L, 灵敏度高于 TaqMan-qPCR 方法 (10^2 copies/ μ L)。Zhang 等^[28]建立了一种快速检测传染性肌坏死病毒的 RPA-LFD 方法, 检测灵敏度为 10^1 copies/ μ L, 不与其他虾病原体发生

交叉反应。与常规 PCR 技术不同的是, RPA 技术不依赖热循环仪, 一般的加热条件均可满足扩增过程, 如恒温水浴锅、人体体温孵育、蓄电池加热装置、简化化学发热装置等^[29]。而且, RPA 反应更快速, 其扩增产物可在 5 min 达到检测阈值, 15–20 min 即可产生大量扩增产物, 结合 LFD 进行检测仅需 2 min 即可完成可视化判读。同时, RPA-LFD 具有更高的检测灵敏度, 其检测限低至 1 copies/ μ L, 灵敏度比常规 PCR 高 10 倍以上。RPA-LFD 的诸多优点决定了其应用于田间、养殖场和基层医疗机构等场景现场检测的巨大潜力, 有望成为病原微生物检测的重要工具之一。然而, 目前 RPA 检测技术仍存在一些局限性。首先, RPA 引物设计体系尚不完善: 由于缺乏专业的引物设计软件且 RPA 引物较长(30–35 bp), 在 35–43 °C 恒温扩增过程中容易产生非特异性扩增(如引物二聚体或脱靶产物), 从而导致假阳性结果。因此, 通常需要设计多组 RPA 引物并通过多轮实验以筛选最佳引物, 同时需尽量避免引物序列中的二级结构和重复序列。其次, 气溶胶污染防控要求严苛: RPA 反应体系易因扩增产物扩散产生交叉污染, 实验环境应尽量保持良好的通风并定期进行

气溶胶清除消杀。采用封闭式检测系统(如一体化芯片)实现“样本进-结果出”的全封闭操作,可有效降低污染风险。另外,商业化成本制约技术普及:重组酶、单链结合蛋白等核心试剂和商业化试剂盒的成本较高,限制了RPA的发展和规模化应用,未来随着国产化试剂的研发和推广,RPA的成本有望逐渐降低。

4 结论

本研究针对PPV高度保守的NS1基因设计引物,经筛选获得一对高特异性引物NS1-F2R2,利用重组酶聚合酶扩增结合侧向流免疫层析技术,建立了一种快速、简便、灵敏、可视化的RPA-LFD方法,可应用于猪源性产品中PPV核酸的现场快速检测。

作者贡献声明

杨芹:实验操作,图片处理,撰写文章;邱雨楼:方案设计,修改文章;孙凯:实验指导;宋斯怡:数据收集;董文怡:数据分析;刘皖皖:数据整理;叶子弘:学术指导,获取基金;俞晓平:提供资源。

作者利益冲突公开声明

作者声明绝无任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

REFERENCES

- [1] DUNNE HW, GOBBLE JL, HOKANSON JF, KRADEL DC, BUBASH GR. Porcine reproductive failure associated with a newly identified "SMEDI" group of picorna viruses[J]. American Journal of Veterinary Research, 1965, 26(115): 1284-1297.
- [2] DENG SF, HAN ZY, ZHU MJ, FAN SQ, ZHANG JY, HUANG YZ, XU HL, CHEN JD. Isolation and phylogenetic analysis of a new porcine parvovirus strain GD2013 in China[J]. Journal of Virological Methods, 2020, 275: 113748.
- [3] CARTWRIGHT SF, LUCAS M, HUCK RA. A small haemagglutinating porcine DNA virus I. isolation and properties[J]. Journal of Comparative Pathology, 1969, 79(3): 371-377.
- [4] BARONE PW, WIEBE ME, LEUNG JC, HUSSEIN ITM, KEUMURIAN FJ, BOURESSA J, BRUSSEL A, CHEN DY, CHONG M, DEGHANI H, GERENTES L, GILBERT J, GOLD D, KISS R, KREIL TR, LABATUT R, LI YL, MÜLLBERG J, MALLET L, MENZEL C, et al. Viral contamination in biologic manufacture and implications for emerging therapies[J]. Nature Biotechnology, 2020, 38(5): 563-572.
- [5] 翟银建, 沈学怀, 潘孝成, 赵瑞宏. 猪细小病毒分子病原学研究进展[J]. 畜牧兽医科学(电子版), 2019(11): 14-17.
ZHAI YJ, SHEN XH, PAN XC, ZHAO RH. Advances in molecular pathogenesis of porcine parvovirus[J]. Veterinary Science (Electronic Version), 2019, 11: 14-17 (in Chinese).
- [6] AFOLABI KO, IWERIEBOR BC, OKOH AI, OBI LC. Increasing diversity of swine parvoviruses and their epidemiology in African pigs[J]. Infection, Genetics and Evolution, 2019, 73: 175-183.
- [7] 周庆雨. 猪细小病毒与圆环病毒 2 型混合感染的诊治[J]. 中国兽医杂志, 2017, 53(8): 42-43, 54.
ZHOU QY. Diagnosis and treatment of mixed infection of porcine parvovirus and circular virus type 2[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2017, 53(8): 42-43, 154 (in Chinese).
- [8] 王浩先, 薛念宇, 倪宏波. 猪普通蓝耳病毒和猪细小病毒及猪沙门氏菌混合感染导致猪流产的实验室诊断[J]. 现代畜牧兽医, 2019(10): 36-41.
WANG HX, XUE NY, NI HB. Laboratory diagnosis of pig embryo abortion caused by mixed infection of PRRSV and porcine parvovirus and porcine *Salmonella*[J]. Modern Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2019(10): 36-41 (in Chinese).
- [9] 葛盛军. 猪细小病毒病 伪狂犬病混合感染防控[J]. 四川畜牧兽医, 2013, 40(9): 50-51.
GE SJ. Prevention and control of pseudorabies mixed infection with porcine parvovirus disease[J]. Sichuan Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2013, 40(9): 50-51 (in Chinese).
- [10] 刘志杰, 周莉, 曾智勇, 李如举. 一例猪细小病毒、猪圆环病毒 2 型、猪繁殖与呼吸综合征病毒混合感染的诊断[J]. 中国畜牧兽医, 2012, 39(6): 204-206.
LIU ZJ, ZHOU L, ZENG ZY, LI RJ. A case diagnosis of co-infection of porcine parvovirus, porcine circovirus type 2 and porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2012, 39(6): 204-206 (in Chinese).
- [11] 吴宇阳, 陈龙彪, 王林青, 崔保安, 卢权威, 钞安军, 李坤, 陈红英, 魏战勇. 猪圆环病毒 2 型和猪细小病毒混合感染的 PCR 检测[J]. 安徽农学通报, 2013, 19(4): 129, 147.
WU YY, CHEN LB, WANG LQ, CUI BA, LU QW, CHAO AJ, LI K, CHEN HY, WEI ZY. PCR detection of mixed infection of porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus[J]. Anhui Agricultural Science Bulletin, 2013, 19(4): 129, 147 (in Chinese).
- [12] 段晓琴, 李亚林. 猪繁殖与呼吸综合征和猪细小病毒混合感染的防控[J]. 畜禽业, 2008(9): 67.
DUAN XQ, LI YL. Prevention and Control of Mixed Infection of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome and Porcine Parvovirus[J]. Livestock and Poultry Industry, 2008, 19(9): 67 (in Chinese).
- [13] SEGALÉS J, ALLAN GM, DOMINGO M. Porcine circovirus diseases[J]. Animal Health Research Reviews, 2005, 6(2): 119-142.
- [14] 王璇, 吴巧彤, 潘淑惠, 文正常. 猪细小病毒的分离与鉴定[J]. 猪业科学, 2018, 35(2): 80-81.

- WANG X, WU YT, PAN SH, WEN ZC. Isolation and identification of porcine parvovirus[J]. *Pig Science*, 2018, 35(2): 80-81 (in Chinese).
- [15] 倪娇, 赵亚荣, 赵建增, 闫国晖, 刘明明, 张弓, 赵锐. 解析猪细小病毒病的 3 种实验室检测方法[J]. *猪业科学*, 2008, 25(4): 97-98.
NI J, ZHAO YR, ZHAO JZ, YAN GH, LIU MM, ZHANG G, ZHAO R. Analysis of three laboratory detection methods for porcine parvovirus disease[J]. *Pig Science*, 2008, 25(4): 97-98 (in Chinese).
- [16] 陈进会, 郭万柱. 猪细小病毒检测技术研究进展[J]. *动物医学进展*, 2005, 26(8): 34-37.
CHEN JH, GUO WZ. Progress on diagnostic techniques in porcine parvovirus[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2005, 26(8): 34-37 (in Chinese).
- [17] 李原野, 李敏, 李桂黎, 黄迪, 徐志文, 朱玲, 岳建国. 猪细小病毒与圆环病毒 3 型双重 PCR 方法的建立与应用[J]. *四川畜牧兽医*, 2020, 47(10): 24-26, 29.
LI YY, LI M, LI GL, HUANG D, XU ZW, ZHU L, YUE JG. Establishment and application of double PCR method for porcine parvovirus and circular virus type 3[J]. *Sichuan Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2020, 47(10): 24-26, 29 (in Chinese).
- [18] 杨奕, 吴发兴, 康京丽, 孙洪涛, 王志亮, 许信刚, 张琪. 猪细小病毒 TaqMan 荧光定量 PCR 检测方法的建立及应用[J]. *动物医学进展*, 2024, 45(2): 75-79.
YANG Y, WU FX, KANG JL, SUN HT, WANG ZL, XU XG, ZHANG Q. Establishment and application of TaqMan fluorescent quantitative PCR method for detection of porcine parvovirus[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2024, 45(2): 75-79 (in Chinese).
- [19] PIEPENBURG O, WILLIAMS CH, STEMPLE DL, ARMES NA. DNA detection using recombination proteins[J]. *PLoS Biology*, 2006, 4(7): e204.
- [20] 孙魁, 邢微微, 徐东刚. 重组酶聚合酶扩增技术的研究进展[J]. *军事医学*, 2015, 39(10): 802-804, 807.
SUN K, XING WW, XU DG. Advances in recombinase polymerase amplification[J]. *Military Medical Sciences*, 2015, 39(10): 802-804, 807 (in Chinese).
- [21] 郭正洋, 刘钟栋, 刘小青, 陈晶, 兰全学. 重组酶聚合酶扩增技术的研究进展[J]. *食品科技*, 2018, 43(9): 55-59.
GUO ZY, LIU ZD, LIU XQ, CHEN J, LAN QX. Research progress of recombinase polymerase amplification[J]. *Food Science and Technology*, 2018, 43(9): 55-59 (in Chinese).
- [22] 施奕, 徐昌平, 余蓓蓓, 卢亦愚, 梅玲玲. 重组酶聚合酶扩增技术研究进展[J]. *病毒学报*, 2020, 36(3): 522-532.
SHI Y, XU CP, YU BB, LU YY, MEI LL. Research progress in recombinase polymerase amplification (RPA)[J]. *Chinese Journal of Virology*, 2020, 36(3): 522-532 (in Chinese).
- [23] 王帅, 杨艳歌, 吴占文, 李红娜, 李涛, 孙冬梅, 袁飞. 重组酶聚合酶扩增、重组酶介导等温扩增及酶促重组等温扩增技术在食源性致病菌快速检测中的研究进展[J]. *食品科学*, 2023, 44(9): 297-305.
WANG S, YANG YG, WU ZW, LI HN, LI T, SUN DM, YUAN F. A review of the application of recombinase polymerase amplification, recombinase-aided amplification and enzymatic recombinase amplification in rapid detection of foodborne pathogens[J]. *Food Science*, 2023, 44(9): 297-305 (in Chinese).
- [24] 杨雁婷, 徐雷, 黄瑶, 徐志文, 朱玲. 猪圆环病毒与其它病原共感染的研究进展[J]. *病毒学报*, 2022, 38(4): 1016-1024.
YANG YT, XU L, HUANG Y, XU ZW, ZHU L. Co-infection of the porcine circovirus and other pathogens[J]. *Chinese Journal of Virology*, 2022, 38(4): 1016-1024 (in Chinese).
- [25] 岳丰雄, 崔尚金, 冉多良, 张超范. PCV2 PPV PRV 和 PRRSV 多重 PCR 检测方法的建立及初步应用[J]. *中国兽医科学*, 2008, 38(8): 691-696.
YUE FX, CUI SJ, RAN DL, ZHANG CF. Establishment and application of a multiplex PCR assay for simultaneous detection of PCV2, PPV, PRV and PRRSV[J]. *Chinese Veterinary Science*, 2008, 38(8): 691-696 (in Chinese).
- [26] LIU YQ, CHEN LH, ZHANG ZX, ZHANG R, XU JY, YANG PK, SUN YJ, CHEN YC, XIE CS, LIN M, ZHENG YZ. Development and application of a novel recombinase polymerase amplification-*Pyrococcus furiosus* argonaute system for rapid detection of goose parvovirus[J]. *Poultry Science*, 2024, 103(10): 104141.
- [27] HOU YC, LIU XP, WANG YN, GUO L, WU LY, XIA WR, ZHAO YQ, XING WW, CHEN J, CHEN CG. Establishment and application of a rapid visualization method for detecting *Vibrio parahaemolyticus* nucleic acid[J]. *Infectious Medicine*, 2024, 3(2): 100111.
- [28] ZHANG L, ZHOU QQ, LIU JJ, LIU MR, HU JJ, BAO ZM, WANG MQ. Development of recombinase amplification assays for the rapid detection of infectious myonecrosis virus[J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2024, 205: 108143.
- [29] 王晓勋, 徐嘉良. 重组酶聚合酶扩增技术及其在食品安全领域的应用[J]. *食品科技*, 2018, 43(6): 1-7.
WANG XX, XU JL. Recombinase polymerase amplification technology and its application in the field of food safety detection[J]. *Food Science and Technology*, 2018, 43(6): 1-7 (in Chinese).