

研究报告

非洲猪瘟病毒微滴数字 PCR (ddPCR) 方法的建立及应用

邬旭龙^{1Δ} 肖璐^{2Δ} 宋勇⁵ 林华⁴ 陈世界⁴ 杨苗⁴ 安徽⁴姚学萍^{1,3} 杨泽晓^{1,3} 王印^{1,3*}

(1. 四川农业大学 动物医学院 动物检疫实验室 四川 成都 611130)

(2. 四川省畜牧科学研究院 四川 成都 610066)

(3. 四川农业大学 动物疫病与人类健康四川省重点实验室 四川 成都 611130)

(4. 四川出入境检验检疫局 检验检疫技术中心 四川 成都 610041)

(5. 天津瑞普生物技术股份有限公司 天津 300381)

摘要:【目的】非洲猪瘟病毒(African swine fever virus, ASFV)能导致猪群高死亡率,从而造成严重的经济损失。因此,建立严密、高效的防控系统,包括灵敏、准确的诊断方法以及高效的预报预警机制等,以避免 ASF 传入我国。本文旨在建立一种新型而高灵敏度的 ASFV 微滴数字 PCR (Droplet digital PCR, ddPCR)检测方法。【方法】针对 ASFV K205R 基因设计一对特异性引物和 TaqMan 探针,通过反应条件优化,建立了 ASFV 实时荧光定量 PCR (qPCR)和 ddPCR 检测方法;并对两种方法的线性关系、灵敏性、特异性和重复性进行了评估,利用建立的 ASFV 检测方法对 163 份国内和进境的组织样本及血清样本进行检测,血清样本经商品化 ASFV ELISA 试剂盒复检,评估不同方法检测结果的符合率。【结果】建立的 ASFV qPCR 和 ddPCR 检测方法线性关系较好($R^2 \geq 0.998$), ddPCR 的最低检测限度可达到 0.36 拷贝,在 20 μ L 反应体系中约为 10 拷贝/反应,检测灵敏度是 qPCR 的 10 倍。ASFV ddPCR 检测方法具有很高的特异性和重复性,不与其他猪常见病毒发生交叉反应。【结论】该方法灵敏度高、特异性强,可作为一种有效的分子生物学方法来诊断 ASFV,为防止该病传入我国以及 ASFV 的实时监测提供新的技术储备,同时促进 ddPCR 技术在我国的发展和应用。

关键词: 微滴数字 PCR, 实时荧光定量 PCR, 非洲猪瘟病毒, 诊断调查

Foundation item: Key Technologies R&D Program of China (No. 2013BAD12B04)

***Corresponding author:** Tel: 86-28-86292116; E-mail: yaanwangyin@tom.com

^ΔThese authors equally contributed to this work

Received: July 06, 2017; **Accepted:** September 27, 2017

基金项目: 国家科技支撑计划项目(No. 2013BAD12B04)

***通讯作者:** Tel: 86-28-86292116; E-mail: yaanwangyin@tom.com

^Δ对本文贡献相同

收稿日期: 2017-07-06; **接受日期:** 2017-09-27

A novel high-sensitivity droplet digital PCR (ddPCR) for detection of African swine fever virus

WU Xu-Long^{1Δ} XIAO Lu^{2Δ} SONG Yong⁵ LIN Hua⁴ CHEN Shi-Jie⁴
YANG Miao⁴ AN Wei⁴ YAO Xue-Ping^{1,3} YANG Ze-Xiao^{1,3} WANG Yin^{1,3*}

(1. College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu, Sichuan 611130, China)

(2. Sichuan Animal Science Academy, Chengdu, Sichuan 610066, China)

(3. Key Laboratory of Animal Disease and Human Health of Sichuan Province, Sichuan Agricultural University, Chengdu, Sichuan 611130, China)

(4. Sichuan Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Chengdu, Sichuan 610041, China)

(5. Tianjin Ringpu Bio-technology Co., Ltd, Tianjin 300381, China)

Abstract: [Objective] African swine fever virus (ASFV) can cause high mortality in swine and lead to huge economic losses. Therefore to establish a strict and efficient control system, including the sensitive and accurate diagnosis methods, effective warning mechanism, which avoid the spread of ASF in China. The aim of this study was to develop a novel and high-sensitive droplet digital PCR (ddPCR) method to detect African swine fever virus (ASFV). **[Methods]** The methods of ASFV real-time quantitative PCR (qPCR) and ddPCR were established and optimal reaction conditions were confirmed based on *K205R* gene of ASFV. Each method was evaluated for linearity, limit of detection and specificity. The methods were tested in 163 specimens which were collected from domestic or imported clinical sample or serum samples. **[Results]** The results indicated that the method both had a high degree of linearity ($R^2 \geq 0.998$). The detection limit of ddPCR reached 0.36 copies and was approximately 10 copies/reaction, which was approximately a 10-fold greater sensitivity than qPCR. The cross-reaction was performed with other porcine pathogens, and negative amplification of the cross-reaction assay demonstrated the high specificity of this method. **[Conclusion]** This high sensitivity and specificity method could be used as an efficient molecular biology tool to diagnose ASFV, which is a reserve technique and very important for prevention of the spread of diseases across borders, and it promotes the development of ddPCR in China.

Keywords: Droplet digital PCR, Real-time quantitative PCR, African swine fever virus, Diagnostic investigation

非洲猪瘟(African swine fever, ASF)是由非洲猪瘟病毒(African swine fever virus, ASFV)引起猪的一种急性、高度接触性传染病^[1]。ASFV 属非洲猪瘟病毒科(Asfarviridae), 是虫媒病毒中唯一的 DNA 病毒^[2], 病毒基因组长约 170–190 kb, 编码 150–200 种蛋白质, 不同病毒株的基因组长度差异位于基因组左端 38–47 kb、右端 13–22 kb 的可变区域, 中央为保守区^[3]。1921 年该病在肯尼亚首次被发现报道^[4], 随后在非洲多数国家、欧洲和南美洲相继暴发和流行^[5], 造成严重的经济损失。野猪和软蜱是 ASFV 的野生储存宿主和传播媒介, 导致病毒可在自然界稳定存在, 通过感染家猪、野猪和蜱来实现饲养环

境与野生环境的循环传播^[6-7]。ASF 临床症状和病理变化与猪瘟很相似^[8], 表现为发热、皮肤发绀和淋巴结、肾、胃肠黏膜明显出血, 强毒株感染的潜伏期短, 死亡率高达 100%^[9]。由于该病病原学和流行病学的复杂性, 且无有效的疫苗用于防疫, 因而被世界动物卫生组织(Office international des epizooties, OIE)列为实时通报的动物疫病, 我国将其列为一类动物疫病^[10]。我国是养猪大国, 应建立严密、高效的防控系统, 包括灵敏、准确的诊断及高效的预报预警机制等, 以避免 ASF 传入我国。

虽然我国目前还没有非洲猪瘟疫病的报道, 但随着国际贸易往来的日益频繁, 该病传入我国的风

险也随之增大。俄罗斯大规模暴发 ASF 疫情^[11], 无疑使得该疫病对我国的威胁进一步加大, 病毒一旦传入我国, 后果将不堪设想, 因此建立一种灵敏、特异的 ASFV 检测方法具有重要意义。微滴数字 PCR (Droplet digital PCR, ddPCR)是近年来兴起的一种新的绝对定量技术, 通过极度稀释实现理论上的单分子扩增, 然后用终点法 PCR 和泊松分布计算出样品的原始浓度^[12-13], 在核酸分子的绝对定量领域具有极大的潜力。由于其不需要建立标准曲线, 在低浓度的核酸含量下也可高度灵敏和准确地对核酸的拷贝数进行绝对定量, 使得 ddPCR 技术得到国内外越来越多的关注和应用, 具有较好的发展前景。本研究通过建立 ASFV ddPCR 检测方法, 并利用该方法对我国进出口相关动物样品及国内动物样品进行检测, 为我国对 ASFV 的实时监控提供数据参考, 也为我国防控该病毒的传入提供技术储备。

1 材料与方法

1.1 病毒、样品信息

ASFV K205R 全基因序列(GenBank 登录号: KP055815)由英潍捷基(InvitrogenTM)人工合成。猪瘟病毒(CSFV)、猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)、日本乙型脑炎病毒(JEV)、猪圆环病毒 2 型(PCV-2)、猪伪狂犬病毒(PRV)、口蹄疫病毒(FMDV)均由四川农业大学动物检疫实验室保存。临床检测样品共计 163 份, 采集于 2016–2017 年。其中包括 28 份中国边境岗哨动物(猪)的血清样本、野猪粪便样本, 由军事医学科学院军事兽医研究所馈赠; 62 份从加拿大进口的种猪血清样本, 由四川出入境检验检疫局检验检疫技术中心馈赠; 73 份国内规模化养猪场采集的有高热症状的猪组织样本, 由四川农业大学动物检疫实验室保存。

1.2 主要试剂和仪器

质粒小量抽提试剂盒、磁珠法病毒 DNA/RNA 提取试剂盒(Magnetic Viral DNA/RNA Kit), 北京天根生化科技有限公司; 微滴生成油(ddPCR droplet

generation oil), Bio-Rad 公司。

普通 PCR 仪、数字 PCR 系统 QX100、96 孔板封口机 PX1、荧光定量 PCR 仪 CFX96, Bio-Rad 公司; 超微量分光光度计 NanoDrop 2000、全自动核酸提取仪, Thermo 公司。

1.3 引物设计

参照 NCBI 中 GenBank 登录的 ASFV 全基因序列(表 1), 通过 DNAMAN 软件对 16 株病毒的全基因组序列进行比对, 选择 K205R 基因的保守区域, 利用 Oligo 及 Primer Premier 软件, 设计并合成特异性引物和 TaqMan 荧光探针, 其上游引物 F: 5'-CAGGCAAAACAAGTGAAACA-3'; 下游引物 R: 5'-GCAAAGTGTCTCATCCAATAT-3'; 探针 Probe: 5'-FAM-TGTTCTTCACGCGTAGCGAATGGGC-BHQ-3', 探针的 5'端标记 FAM 荧光报告基团, 3'端标记荧光淬灭基团 BHQ1。引物和探针均由 InvitrogenTM公司合成。

1.4 ASFV 实时荧光定量 qPCR 反应

人工合成的 ASFV 质粒作为模板进行 qPCR 反应, 分别对引物、探针浓度以及反应退火温度进行优化。反应体系为(20 μ L): 2 \times Premix ExTaq 10 μ L, 上游和下游引物终浓度为 250 nmol/L, TaqMan 探针终浓度为 200 nmol/L, 模板 1 μ L, ddH₂O 补足 20 μ L。反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 3 min; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环, 延伸时进行荧光信号采集。

1.5 ASFV ddPCR 反应

与 qPCR 反应相同的引物和探针进行 ASFV ddPCR 反应, 反应步骤包括: 体系配制、微滴生成、扩增和信号读取分析 4 个步骤^[14]。根据试验指南推荐, ddPCR 反应体系: 2 \times Supermix for probes (without dUTP) 10 μ L, 上、下游引物终浓度为 900 nmol/L, 探针终浓度为 250 nmol/L, 模板 1 μ L, ddH₂O 补足 20 μ L。将 20 μ L 反应液加入微滴生成卡 DG8 中间一排, 再将 70 μ L 微滴生成油加入 DG8 的最底一排, 最后在微滴生成卡上覆盖专用胶垫, 置入微滴生成仪, 自动生成反应微滴。待微滴生成完毕后, 从微滴生成卡的最上一排吸取 40 μ L 生成的油滴, 加入

表 1 ASFV 毒株信息
Table 1 Information of ASFV strains

毒株 Strains	地区 Location	宿主 Host	登录号 Accession No.	时间(年) Time (year)
BA71	西班牙 Spain	野猪 Susscrofa	KP055815	1971
Benin97/1	贝宁 Benin	家猪 Domesticpigs	AM712239	1997
OURT88/3	葡萄牙 Portugal	蜱 Tick	AM712240	1988
E75	西班牙 Spain	家猪 Domesticpig	FN557520	1975
Georgia2007/1	格鲁吉亚 Georgia	家猪 Domesticpig	FR682468	2007
Kenya1950	肯尼亚 Kenya	家猪 Domesticpig	AY261360	1950
MalawiLil20/1	马拉维 Malawi	蜱 Tick	AY261361	1983
Mkuzi	祖鲁兰 Zululand	蜱 Tick	AY261362	1979
Pretoriuskop/96/4	南非 SouthAfrica	蜱 Tick	AY261363	1996
Tengani62	马拉维 Malawi	家猪 Domesticpig	AY261364	1962
Warmbaths	南非 SouthAfrica	蜱 Tick	AY261365	1987
Warthog	纳米比亚 Namibia	野猪 Warthog	AY261366	1980
Ken05/Tk1	肯尼亚 Kenya	蜱 Tick	KM111294	2005
Ken06.Bus	肯尼亚 Kenya	家猪 Domesticpig	KM111295	2006
L60	葡萄牙 Portugal	家猪 Domesticpig	KM262844	1960
NHV	葡萄牙 Portugal	家猪 Domesticpig	KM262845	1968

96 孔反应板内,用预热好的 PX1 热封仪对其进行封膜,封膜运行程序为 180 °C 10 s。封膜后将 96 孔板放入 PCR 仪进行扩增,反应条件为: 95 °C 10 min; 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 40 个循环; 98 °C 10 min。扩增结束后,将 96 孔板置入微滴读取仪中进行信号读取,并使用软件 Quanta soft V1.3.2.0 分析实验数据,获得检测结果并分析。

1.6 灵敏性试验

为评估 ASFV qPCR 和 ddPCR 试验的线性关系、灵敏性和扩增效率,用超微量分光光度计 NanoDrop 2000 测定 ASFV 质粒浓度,并计算拷贝数后进行系列 10 倍梯度稀释(10^8 – 10^0 copies/ μ L),取适当范围的稀释度作为模板,用已建立的 ASFV qPCR 和 ddPCR 测定两种方法的最低检出限度,绘制标准曲线并进行线性分析。

1.7 特异性试验

分别提取 CSFV、PRRSV、JEV、PCV-2、PRV、FMDV 基因组核酸 RNA/DNA, RAN 反转录成

cDNA,已建立的 ASFV ddPCR 方法分别对其进行检测,同时设置阴性对照,评估该方法的特异性。

1.8 重复性试验

以系列 10 倍梯度稀释的质粒为模板(10^4 – 10^1 copies/ μ L)进行 ddPCR 反应,每个浓度设立 3 孔重复,同样的反应条件分别进行 3 次试验,计算该方法的组间及组内变异系数,评估该方法的重复性。

1.9 临床样品检测

用已建立的 ASFV ddPCR 和 qPCR 检测方法分别对 163 份临床样品进行检测,对 ASFV 感染进行实时监控调查。血清样品用商品化试剂盒 ASFV ELISA Kit 进行复检,确保检测结果的准确性。

2 结果与分析

2.1 ASFV ddPCR 和 qPCR 方法的建立

根据试验指南推荐制备 ddPCR 反应体系,对反应退火温度进行优化,建立了 ASFV ddPCR 检测方法。由图 1 可知当退火温度为 50–60 °C 时均检测到

荧光信号,在 58–60 °C 时扩增振幅最大,选择 60 °C 为反应退火温度。

将连续 10 倍梯度稀释的 ASFV 质粒作为标准品,已建立的 ddPCR 和 qPCR 方法分别对其进行测定,并绘制标准曲线(图 2)。结果显示,ASFV ddPCR 和 qPCR 线性关系 $R^2\geq 0.998$,表明两种方法均具有较好的线性关系。

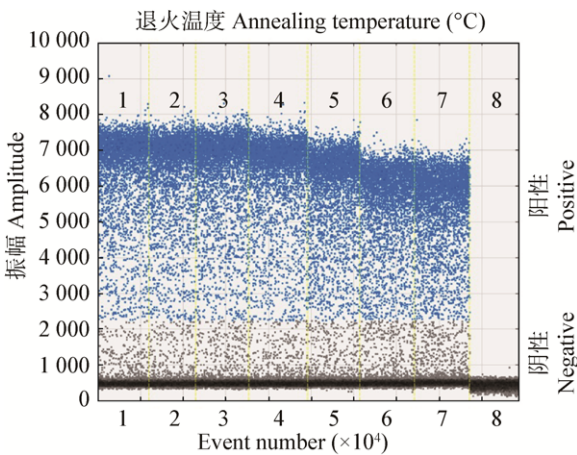


图 1 ASFV ddPCR 退火温度的优化
Figure 1 The assay was optimized with different annealing temperatures
注: 1–7: 60.0、59.2、58.0、56.1、53.8、51.0、50.0 °C; 8: 阴性对照。
Note: 1–7: 60.0, 59.2, 58.0, 56.1, 53.8, 51.0 and 50.0 °C, respectively; 8: Negative control.

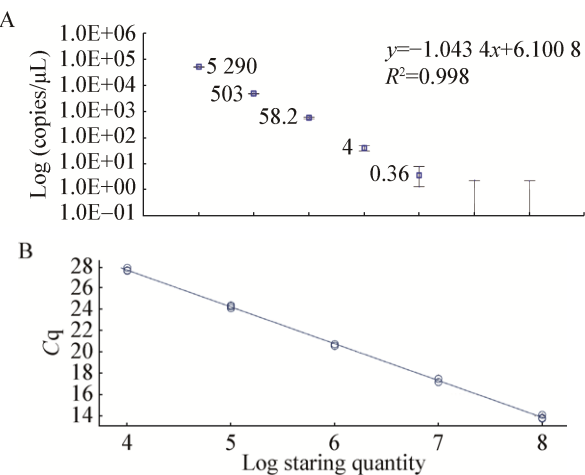


图 2 ASFV ddPCR (A)和 qPCR (B)标准曲线
Figure 2 The standard curves of ASFV ddPCR (A) and qPCR (B)

2.2 灵敏性试验结果

测定 ASFV 质粒浓度,将系列 10 倍梯度稀释 (10^5-10^0 copies/ μ L)的质粒作为模板,测定 ASFV ddPCR 和 qPCR 检测灵敏度。结果显示,建立的 ASFV ddPCR 方法的最低检测极限大约为 1×10^1 拷贝,ASFV qPCR 方法的最低检测极限大约为 1×10^2 拷贝(表 2)。表明 ASFV ddPCR 比 qPCR 检测方法具有更高的检测灵敏度,且 ddPCR 在不需要标准品为参考的同时,能实现样本中核酸含量的绝对定量。

2.3 ASFV ddPCR 特异性试验结果

将提取和制备的 CSFV、PRRSV、JEV、PRV、PCV-2、FMDV 基因组核酸 cDNA/DNA 作模板,评估建立的 ASFV ddPCR 方法特异性。结果显示,各孔微滴生成量均衡,微滴数量均大于 13 000 (图 3A),表明试验数据可信,结果成立。而且仅有 ASFV 检测孔出现阳性微滴,CSFV、PRRSV、JEV、PCV-2、PRV 及 FMDV 均不存在交叉反应,这 6 种病毒试验孔均未检出到阳性微滴信号(图 3B)。表明建立的 ASFV ddPCR 检测方法具有较高的特异性。

2.4 ddPCR 重复性试验结果

以 4 个浓度梯度的 ASFV 质粒为模板进行重复性试验,每个浓度设置 3 个重复孔,取 3 孔平均值计算其变异系数。由表 3 可知,各浓度的测定、计算拷贝数值与 ddPCR 软件分析数值基本吻合,组内和组间变异系数分别在 2.84%–5.16%、3.68%–5.14%之间,证明所建立的 ASFV ddPCR 检测方法重复性良好,检测结果可靠。

表 2 ASFV ddPCR 和 qPCR 检测灵敏度比较 Table 2 Comparative detection limit of the ASFV ddPCR and qPCR assays		
质粒初始浓度 Plasmid initial concentration (copies/ μ L)	ddPCR 测定浓度 Detected concentration (copies/reaction)	qPCR Cq 值 Cq value
1×10^5	105 800.0	24.86
1×10^4	10 060.0	28.25
1×10^3	1 164.0	31.94
1×10^2	80.0	34.24
1×10^1	7.2	37.93 (阴性)
1×10^0	—	—

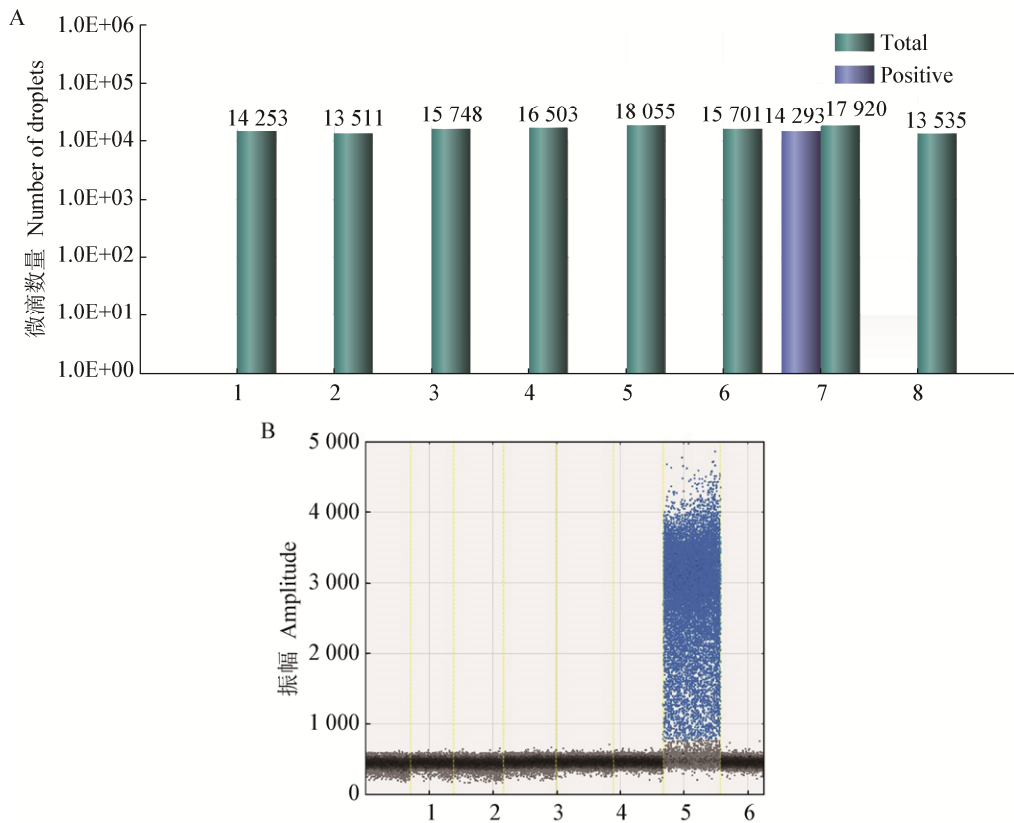


图 3 ASFV ddPCR 特异性试验

Figure 3 Specificity assay of ASFV ddPCR assay

注：A：阳性微滴与总微滴的比例；B：ddPCR 荧光振幅。1–7：CSFV、PRRSV、JEV、PCV-2、PRV、FMDV、ASFV；8：阴性对照。
Note: A: The ratio of positive events to total partitions; B: The fluorescence amplitude of ASFV amplification. 1–7: CSFV, PRRSV, JEV, PCV-2, PRV, FMDV, ASFV; 8: Negative control.

表 3 ASFV ddPCR 重复性试验
Table 3 Repeatability and reproducibility of ASFV ddPCR

质粒浓度 Concentration (copies/ μ L)	组内试验 Intra-assay variation			组间试验 Inter-assay variation		
	平均值 Mean	标准差	变异系数	平均值 Mean	标准差	变异系数
	(copies/reaction)	SD	CV (%)	(copies/reaction)	SD	CV (%)
10^4	10 680.0	448.56	4.20	9 880.0	363.58	3.68
10^3	1 164.0	33.06	2.84	1 006.0	51.71	5.14
10^2	81.0	4.18	5.16	72.0	3.63	5.04
10^1	9.9	0.41	4.14	8.4	0.36	4.29

2.5 临床样本检测

采用本文所建立的 ASFV qPCR 和 ddPCR 检测方法分别对上述共计 163 份猪样品进行检测，其中血清样本同时采用商业化 ASFV ELISA 检测试剂盒进行复检。结果显示，ASFV qPCR 和 ddPCR 检测结果均为阴性，血清样品 ELISA 复检结果与核酸检

测结果一致，证实检测结果可信度较高，表明此研究对国内 ASFV 跨境传播的实时监控中未发现 ASFV 的感染。

3 讨论

ASF 是一种烈性传染病，我国目前尚无 ASF 疫情的报道，然而 ASFV 在非洲、欧洲等地区肆虐，

造成严重的经济损失^[15]。近年来, 中国同非洲国家日益频繁的贸易往来, 是我国传入 ASF 的一个必须引起重视的风险因素。俄罗斯与我国边境漫长, 而俄罗斯国内 ASF 疫情的不断扩散, 也严重威胁我国边境地区的安全。ASF 一旦传入中国, 必定对我国养猪业造成毁灭性打击, 目前仍无有效的 ASFV 疫苗对该疾病进行预防, 该病防控的最主要措施仍是检疫, 因此建立一种 ASFV 灵敏且特异的检测方法显得尤为重要。目前, 国内对 ASFV 检测方法的研究主要以编码病毒结构蛋白的 *p72*、*p54* 等基因为主^[16-17], 而 *K205R* 研究相对较少。ASFV *K205R* 基因序列非常保守, 研究表明病毒在感染宿主细胞 4 h 后, *K205R* 就在细胞内进行复制与翻译^[18-19], 使得 *K205R* 基因逐渐受到国内外越来越多的关注, 无论在 ASFV 感染机体的早期还是中后期, 均可用作目标基因来检测病毒抗原, 为建立及时检测 ASFV 方法提供了有力保证, 也对今后 ASFV 检测试剂盒的开发具有重要的指导意义。

微滴数字 PCR (ddPCR) 是近年来兴起的一种新的绝对定量技术, 通过极度稀释实现理论上的单分子扩增, 然后利用 PCR 和泊松分布计算出样品的原始浓度。ddPCR 是继普通 PCR 和 qPCR 之后的第三代 PCR 技术, 在反应过程中, 反应混合液被分割成 10 000–20 000 个油滴, 每个油滴对应一个独立的微滴反应单元, 目标 DNA 也被随机组合到独立微滴中, 通过 PCR 扩增, 每个微滴以流式检测的方式逐一被单独检测分析, 可以检测样本中极低含量核酸分子, 且不需要标准曲线而实现绝对定量。随着该技术的不断发展, ddPCR 已经被广泛应用于各种研究, 如病原体诊断^[20]、基因突变检测^[21]和转基因研究^[22]等, 具有较好的应用前景。与实时荧光定量 PCR 相比, ddPCR 具有更高的检测灵敏度, 且无需标准品, 也不依赖于标准曲线, 采用终点 PCR 信号计数检测不依赖于 C_t 值, 能有效克服 PCR 抑制剂的影响, 是一种更加理想的进行基因扩增检测和核酸定量分析的新方法。

本研究针对 ASFV 的 *K205R* 基因序列设计特异

性引物和 TaqMan 探针, 建立了 ASFV qPCR 和 ddPCR 检测方法, 并对两种方法的检测灵敏度、线性关系进行比较和分析。试验表明建立的 ASFV qPCR 和 ddPCR 检测方法灵敏、特异、准确, 构建的标准曲线具有较好的线性关系, 组内、组间变异系数均小于 6%, 重复性较好, ddPCR 的最低检测限为 0.36 拷贝, 约为 10 拷贝/反应, 具有较高的检测灵敏度, 在机体低病毒含量的早期感染或潜伏感染的诊断中潜力巨大。该方法与其他猪常见病毒不发生交叉反应, 特异性较强, 能有效应用于临床样品检测。该方法的建立为我国口岸预防 ASFV 的侵入提供了有力的技术储备, 同时也为病毒的定量检测提供了一种新思路。

参考文献

- [1] Lin XM, Han XQ, Wang JL, et al. Exotic Animal Disease[M]. Beijing: Science Press, 2014: 258-269 (in Chinese)
林祥梅, 韩雪清, 王景林, 等. 外来动物疫病[M]. 北京: 科学出版社, 2014: 258-269
- [2] Sánchez EG, Quintas A, Nogal M, et al. African swine fever virus controls the host transcription and cellular machinery of protein synthesis[J]. Virus Research, 2013, 173(1): 58-75
- [3] Zhang XY. Establishment and reagent reserve of laboratory diagnostic techniques for African swine fever virus[D]. Yangzhou: Doctoral Dissertation of Yangzhou University, 2015 (in Chinese)
张鑫宇. 非洲猪瘟病毒实验室诊断技术研究及试剂储备[D]. 扬州: 扬州大学博士学位论文, 2015
- [4] Montgomery RE. On a form of swine fever occurring in British East Africa (Kenya Colony)[J]. Journal of Comparative Pathology and Therapeutics, 1921, 34: 159-191
- [5] De Glanville WA, Vial L, Costard S, et al. Spatial multi-criteria decision analysis to predict suitability for African swine fever endemicity in Africa[J]. BMC Veterinary Research, 2014, 10: 9
- [6] Burrage TG. African swine fever virus infection in *Ornithodoros ticks*[J]. Virus Research, 2013, 173(1): 131-139
- [7] de Carvalho Ferreira HC, Tudela Zúquete S, Wijnveld M, et al. No evidence of African swine fever virus replication in hard ticks[J]. Ticks and Tick-borne Diseases, 2014, 5(5): 582-589
- [8] Ronish B, Hakhverdyan M, Ståhl K, et al. Design and verification of a highly reliable Linear-After-The-Exponential PCR (LATE-PCR) assay for the detection of African swine fever virus[J]. Journal of Virological Methods, 2011, 172(1/2): 8-15
- [9] Atuhair DK, Afayoa M, Ochwo S, et al. Prevalence of African swine fever virus in apparently healthy domestic pigs in Uganda[J]. BMC Veterinary Research, 2013, 9: 263
- [10] Wang H, Wang JW, Xu TG, et al. Advances in studies of

- epidemiology and diagnostic technologies for African swine fever[J]. Chinese Veterinary Science, 2008, 38(6): 544-548 (in Chinese)
- 王华, 王君玮, 徐天刚, 等. 非洲猪瘟流行病学和诊断方法的研究进展[J]. 中国兽医科学, 2008, 38(6): 544-548
- [11] Gibbens N. Foot-and-mouth disease in Bulgaria and African swine fever in Russia[J]. The Veterinary Record, 2011, 168(5): 136-137
- [12] Jiang Y, Hu JY, Yang LT. Estimating the exogenous genes copy number of genetically modified organisms by droplet digital PCR[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2014, 22(10): 1298-1305 (in Chinese)
- 姜羽, 胡佳莹, 杨立桃. 利用微滴数字 PCR 分析转基因生物外源基因拷贝数[J]. 农业生物技术学报, 2014, 22(10): 1298-1305
- [13] Sedlak RH, Jerome KR. Viral diagnostics in the era of digital polymerase chain reaction[J]. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2013, 75(1): 1-4
- [14] Pinheiro LB, Coleman VA, Hindson CM, et al. Evaluation of a droplet digital polymerase chain reaction format for DNA copy number quantification[J]. Analytical Chemistry, 2012, 84(2): 1003-1011
- [15] Bao JY, Wang ZL. African swine fever epidemiology research progress[J]. China Animal Health Inspection, 2013, 30(6): 72-76 (in Chinese)
- 包静月, 王志亮. 非洲猪瘟流行病学研究进展[J]. 中国动物检疫, 2013, 30(6): 72-76
- [16] Cao CF, Liang YH, Tao H, et al. Prokaryotic expression of P54 gene of African swine fever virus and establishment of indirect ELISA for detection of its antibody against p54[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2014, 35(2): 6-10 (in Chinese)
- 曹琛福, 梁云浩, 陶虹, 等. 非洲猪瘟病毒 p54 基因的原核表达及其抗体的间接 ELISA 检测方法的建立[J]. 动物医学进展, 2014, 35(2): 6-10
- [17] Li HL, Cao JS, Wang JW, et al. Construction and application of real-time quantitative PCR for detection of African swine fever virus[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2012, 39(6): 37-40 (in Chinese)
- 李洪利, 曹金山, 王君玮, 等. 非洲猪瘟病毒实时荧光定量 PCR 检测方法的建立及应用[J]. 中国畜牧兽医, 2012, 39(6): 37-40
- [18] Wu XL, Peng B, Jiang RJ, et al. Development of an indirect ELISA for detection of antibody against African swine fever virus (ASFV) with prokaryotic expressed ASFV pK205R protein as the coating antigen[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2016, 38(10): 800-803 (in Chinese)
- 邬旭龙, 彭彬, 姜睿姣, 等. 以原核表达的非洲猪瘟病毒 pK205R 蛋白为包被抗原的间接 ELISA 抗体检测方法的建立[J]. 中国预防兽医学报, 2016, 38(10): 800-803
- [19] Gutiérrez-Castañeda B, Reis AL, Corteyn A, et al. Expression, cellular localization and antibody responses of the African swine fever virus genes B602L and K205R[J]. Archives of Virology, 2008, 153(12): 2303-2306
- [20] Wang J, Liu YM, Li CX, et al. Detection of *Listeria monocytogenes* cells in food based on SD-PMA-ddPCR[J]. Microbiology China, 2016, 43(10): 2306-2313 (in Chinese)
- 王静, 刘玉敏, 李春喜, 等. SD-PMA-ddPCR 检测食品中单核细胞增生李斯特氏菌[J]. 微生物学通报, 2016, 43(10): 2306-2313
- [21] Brambati C, Galbiati S, Xue E, et al. Droplet digital polymerase chain reaction for DNMT3A and IDH1/2 mutations to improve early detection of acute myeloid leukemia relapse after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation[J]. Haematologica, 2016, 101(4): e157-e161
- [22] Gerdes L, Iwobi A, Busch U, et al. Optimization of digital droplet polymerase chain reaction for quantification of genetically modified organisms[J]. Biomolecular Detection and Quantification, 2016, 7: 9-20