

# 猪瘟病毒实时荧光 LAMP 检测方法的建立

龚晗悦, 曹炜伟, 石磊, 陈洵, 宋安华, 叶蕾

(暨南大学食品安全与营养研究院, 广东广州 510632)

**摘要:** 为做好猪瘟的早期诊断和及时预防, 建立一种快速检测猪瘟病毒(Classical swine fever virus, CSFV)的实时荧光环介导等温扩增方法。试验利用 Primer Explorer version 4 针对 CSFV 的 5'UTR 非编码区设计 4 组引物, 筛选出最佳引物后建立 CSFV 的实时荧光环介导等温扩增检测方法, 并对该方法的特异性、灵敏度以及适用性进行验证。结果显示, 本试验建立的实时荧光环介导等温扩增方法对 128 份临床样本和 22 份猪瘟活疫苗人工干扰样本的检测方法与实时荧光聚合酶链式反应检测方法一致。该方法仅对猪瘟病毒有扩增反应, 且最低检测浓度为 10 fg/ $\mu$ L, 对猪伪狂犬病毒、高致病性高致病型猪繁殖与呼吸综合征病毒、猪圆环病毒 2 型等 8 种病原无扩增反应。本试验建立的实时荧光环介导等温扩增方法特异性强、灵敏度高, 检测效果好, 操作简单, 适用于 CSFV 临床样本的快速检测。

**关键字:** 猪瘟病毒; 实时荧光环介导等温扩增; 特异性检测

文章编号: 1673-9078(2019)010-261-267

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.10.035

## Establishment of Real-time Fluorescence Loop-mediated Isothermal Assay for Detection of Classical Swine Fever Virus

GONG Han-yue, CAO Wei-wei, SHI Lei, CHEN Xun, SONG An-hua, YE Lei

(Institute of Food Safety and Nutrition Jinan University, Guangzhou 510632, China)

**Abstract:** In order to make early diagnosis and prompt prevention of swine fever, a real-time fluorescent loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of classical swine fever virus (CSFV) was established. Using Primer Explorer version 4 to design 4 sets of primers for the 5'UTR non-coding region of CSFV, the best primers were selected to establish a real-time fluorescent loop-mediated isothermal amplification assay for CSFV, and the specificity, sensitivity and applicability were verified. The results showed that the real-time fluorescent loop-mediated isothermal amplification method established in this experiment was consistent with the real-time fluorescent polymerase chain reaction detection method for 128 clinical samples and 22 artificial interference sample by hog cholera live vaccine. This method only has amplified reaction for classical swine fever virus and the minimum detectable concentration was 10 fg/ $\mu$ L. There were no amplified reactions for eight pathogens such as virulence, highly pathogenic highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2. The real-time fluorescent loop-mediated isothermal amplification method established in this experiment has strong specificity, high sensitivity, good detection effect and simple operation, so is suitable for rapid detection of clinical samples of CSFV.

**Key words:** classical swine fever virus; real-time fluorescence loop-mediated isothermal; specific detection

猪瘟 (Classical swine fever, CSF; 又称 Hog cholera, HC) 是一种由经典的猪瘟病毒(Classical swine fever virus, CSFV)引起的高度接触性、传染性疾病, 在亚洲、欧洲的多个国家均有报道<sup>[1,2]</sup>。该病的高发率和高死亡率给全球范围内的养猪业造成巨大经济损失, 严重危害畜牧业的发展<sup>[3]</sup>。目前国内猪瘟疫情的

收稿日期: 2019-05-07

基金项目: 广东省自然科学基金项目(2017A030310175); 国家重点研发计划畜禽养殖专项(2016YFD0500600); 广东省科技计划项目(2017B020207004)

作者简介: 龚晗悦(1996-), 女, 硕士, 研究方向: 食品微生物检测技术

通讯作者: 叶蕾(1983-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 食品微生物检测技术

术

主要特点为温和性、散发性、多种病原混合感染、隐性感染和亚病毒感染等, 非典型猪瘟病理变化的情况时有发生, 这对 CSF 的临床诊断带来了很大的困难<sup>[4]</sup>。

目前诊断 CSFV 主要有病毒分离鉴定<sup>[5]</sup>、血清学方法<sup>[6]</sup>、免疫组化<sup>[7]</sup>和酶联免疫吸附试验等方法, 但这些方法因其都存在技术要求高、用时长、操作繁琐和灵敏度低等缺点, 不适用于日常对猪瘟的诊断分析。分子生物学方法近年来广泛应用于 CSFV 的检测和诊断, 其中包括反转录聚合酶链式反应(reverse transcriptase polymerase chain reaction, RT-PCR)和实时荧光 PCR(real time polymerase chain reaction, real-time PCR)<sup>[8]</sup>。这些 PCR 检测方法存在反应时间

长、仪器复杂和成本高等问题<sup>[9]</sup>。因此,迫切需要研究开发一种快速准确、经济适用而且易于操作的分子生物学检测方法,以便应用于广大基层单位,提升基层用户的诊断水平。

实时荧光环介导等温扩增反应(real-time loop-mediated isothermal amplification, RT-LAMP)是利用实时荧光监测仪在反应体系内加入核酸荧光染料,随着DNA量在反应中不断增加,荧光信号也随之增强的原理,研发的一种新型核酸扩增技术。具有反应快速、敏感度高、特异性强和成本低廉等特点<sup>[9]</sup>。本研究基于实时荧光LAMP检测技术针对猪瘟病毒5'UTR的保守区域设计猪瘟病毒检测方法,以实现快速准确、易于操作的检测目的,旨在为该病的快速诊断提供技术参考依据,做到对猪瘟的早期诊断和预防,从源头上控制疫情发展。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 病毒核酸及被检样品

猪瘟活疫苗,购自广东永顺生物制药有限公司和中牧实业股份有限公司;高致病性猪呼吸与繁殖综合征活疫苗(GDr180),购自广东永顺生物制药有限公司和哈尔滨兽医研究所;猪圆环病毒2型活疫苗,购自哈尔滨兽医研究所和武汉科前生物股份有限公司;伪狂犬活疫苗,购自广东永顺生物制药有限公司和哈尔滨兽医研究所;高致病性猪呼吸与繁殖综合征活疫苗(JXA1-R),购自广东大华农动物保健品股份有限

公司;猪瘟临床样本,由广东永顺生物制药有限公司惠赠。

#### 1.1.2 主要试剂和耗材

Bst DNA polymerase large fragment,购自美国New England Biolabs公司;SYTO-9荧光染料,购自美国Life Technologies Corporation;引物(正向外引物F3、反向外引物B3、正向内引物FIP、反向内引物BIP、正向环引物LoopF、反向环引物LoopB),订自生工生物工程(上海)有限公司;病毒RNA/DNA提取试剂盒(R4410-03),购自广州美基生物公司;DNA扩增试剂盒(恒温荧光法)(051011L),购自广州双螺旋基因技术有限公司。

#### 1.1.3 主要仪器设备

-80℃冻存柜, DAYA-024, 美国 Thermo Fisher Scientific; 高速台式离心机, PICO17, 美国 Thermo Fisher Scientific; 漩涡混合器, MS 2, 德国 IKA 公司; 微量移液器, 1000 μL、200 μL、100 μL、10 μL、2.5 μL 美国 Thermo Fisher Scientific; QuantStudio™ 6 Flex, 美国 Life Technologies。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 引物设计

根据LAMP引物设计原则,应用在线引物设计软件Primer Explorer version 4(<http://primerexplorer.jp/e>)针对CSFV 5'UTR的保守区域进行LAMP引物设计,包括2条内引物(FIP和BIP)、2条外引物(F3和B3)和2条环引物(LF和LB)具体引物信息见表1。所有引物由生工生物工程(上海)有限公司合成。

表1 引物序列列表

Table 1 Primer sequences

名称	引物探针名称	序列
CFSV-1	CFSV-F3-1	GTATACGAGGTTAGTYTCRTYCTC
	CFSV-B3-1	GCCATGWACAGCAGAGATT
	CFSV-FIP-1	TCGAACTACTGACGACTGTCCTTGCCCAAYAGTAGGACTAGC
	CFSV-BIP-1	YGAGATGCTAYGTGGACGAGGCCATCAGGTCGTRCYCC
	CFSV-LF-1	GTACTIONCAGGACTTAGACCACC
	CFSV-LB-1	CATGCCCAAGACACACT
	CFSV-2	CFSV-F3-2
CFSV-B3-1		GCCATGWACAGCAGAGATT
CFSV-FIP-2		CCTCGTCCACATAGCATCTCGGGTGGTCTAAGTCCTGAGT
CFSV-BIP-2		TGCCCAAGACACACCTTAACCCCTATCAGGTCGTRCYCC
CFSV-LF-2		GACTIONCAGGACTTAGACCACC
CFSV-LB-2		GGGTCGCTAGGGTGAAATC

转下页

接上页

	CFSV-F3-2	TGCCAYAGTAGGACTAGC
	CFSV-B3-1	GCCATGWACAGCAGAGATT
CFSV-3	CFSV-FIP-3	GGCYTCTGCTCACGTCGAAGGTGGTCTAAGTCCTGAGT
	CFSV-BIP-3	YGAGATGCTATGTGGACGAGGCCTATCAGGTCGTGCTCC
	CFSV-LF-3	CTACTGACGACTGTCCTGT
	CFSV-LB-1	CATGCCCAAGACACACCT
	CFSV-F3-2	TGCCAYAGTAGGACTAGC
	CFSV-B3-1	GCCATGWACAGCAGAGATT
CFSV-4	CFSV-FIP-3	GGTGGGCTYCTGCTCACG GGTGGTCTAAGTCCTGAGT
	CFSV-BIP-3	YGAGATGCTATGTGGACGAGGCCTATCAGGTCGTGCTCC
	CFSV-LF-2	GAACTACTGACGACTGTCCTG
	CFSV-LB-1	CATGCCCAAGACACACCT

### 1.2.2 病毒 DNA/RNA 的提取

按照美基公司的 DNA/RNA 提取试剂盒 (R4410-03) 说明书进行操作。

### 1.2.3 含 CSFV 靶基因的阳性质粒的构建

以 CSFV cDNA 为模板, 用特异性引物 (上游引物 FP: GTATACGAGGTTAGT; 下游引物 BP: GTGCCATGAACAGCAGAGATTT) 进行 PCR 反应, 将目的片段与 pMD18-T 载体进行连接, 质粒载体转化 DH-5 $\alpha$  感受态细胞, 挑菌培养, PCR 及测序方法验证克隆。

### 1.2.4 引物的筛选及反应体系的建立

参照 DNA 扩增试剂盒 (恒温荧光法) (051011L) 说明书, 25  $\mu$ L 反应体系成分如下: 反应液 RM 12.5  $\mu$ L, 超纯水 DW 8  $\mu$ L, 10 $\times$ SYTO-9 0.5  $\mu$ L, 引物 PM 1  $\mu$ L, Bst 酶 1  $\mu$ L 以及模板 2  $\mu$ L。将混合物置于反应孔中, 于 63  $^{\circ}$ C 恒温反应 60 min。其中引物 PM 的浓度为: 内引物: 环引物: 外引物=8:4:1。

### 1.2.5 特异性实验

利用建立的 CSFV 实时荧光 LAMP 检测方法分别对猪伪狂犬病毒、高致病型猪繁殖与呼吸综合征病毒、猪圆环病毒 2 型、猪胸膜炎放线杆菌、大肠杆菌、副猪嗜血杆菌、金黄色葡萄球菌和沙门氏菌的核酸 (浓度为 1 ng/ $\mu$ L) 进行检测, 采用 1.2.4 的反应体系进行恒温扩增, 验证该方法的特异性。

### 1.2.6 灵敏度实验

将 CSFV 质粒 DNA 进行连续 10 倍梯度稀释, 稀释梯度从 1 ng/ $\mu$ L 到 1 $\times$ 10<sup>-8</sup> ng/ $\mu$ L, 即 0.01 fg/ $\mu$ L, 采用 1.2.4 的反应体系进行恒温扩增, 反应条件为: 63  $^{\circ}$ C 恒温反应 30 min。

### 1.2.7 适用性评价实验

参照国家标准《猪瘟疫病毒实时荧光 RT-PCR 检测

方法》(GB/T 27540-2011), 用实时荧光 real-time PCR 和本研究建立的 CSFV 实时荧光 LAMP 同时检测 128 份临床样品, 通过阴阳性检测结果的比对, 评价其适用性。

### 1.2.8 临床样本实际应用

参照国家标准《猪瘟疫病毒实时荧光 RT-PCR 检测方法》(GB/T 27540-2011), 用实时荧光 real-time PCR 对 22 份临床样品进行检测, 确认检测结果为阴性后, 分别取 18  $\mu$ L 临床样品核酸添加 2  $\mu$ L 从猪瘟疫活疫苗提取的猪瘟疫病毒 RNA (浓度为 1 ng/ $\mu$ L), 振荡混匀, 制成人工污染带有猪瘟疫病毒 RNA 的临床样品。同时用参照国家标准的实时荧光 RT-PCR 检测方法和本研究建立的 CSFV 实时荧光 LAMP 检测方法检测人工干扰后的临床样品, 通过阴阳性检测结果的比对, 评价 CSFV 实时荧光 LAMP 检测方法的检测效果是否受不同的临床样品背景干扰。

## 2 结果与讨论

### 2.1 结果

#### 2.1.1 引物筛选与反应体系的建立

以超纯水和 100 pg/ $\mu$ L CSFV 质粒 DNA 为阴阳性模板, 分别对上述设计的 4 套引物进行两个重复的实时荧光 LAMP 扩增反应。引物筛选结果如图 1 至图 4 所示: 4 套引物均出现明显的 S 型扩增曲线, 能扩增出相应产物, 但是产物出现的时间和荧光强度有差异。对比引物筛选检测结果图可知, 引物 CSFV-2 在扩增反应的 10 个循环之前出峰, 而引物 CSFV-1、CSFV-3、CSFV-4 均在 15 个循环之后出峰, 并且引物 CSFV-2 的荧光值最高。由于引物 CSFV-2 的出峰时间最早, 扩增效率最高, 故选用该引物组进行后续分析。

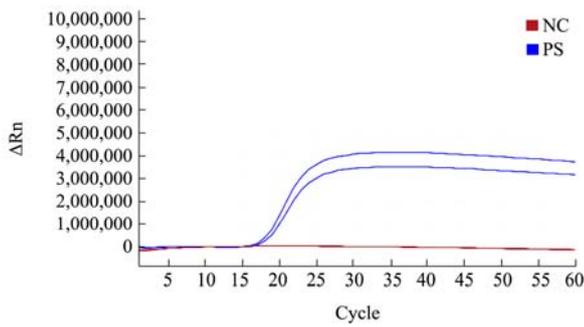


图1 CSFV-1 引物筛选检测结果

Fig.1 CSFV-1 primer screening test results

注：阳性对照：100 pg/μL CSFV 质粒 DNA；阴性对照：超纯水。图 2~6 同。

检测方法仅对 CSFV 产生扩增，具有良好的特异性。

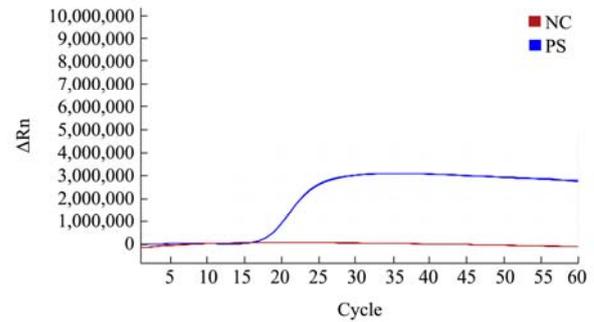


图4 CSFV-4 引物筛选检测结果

Fig.4 CSFV-4 primer screening test results

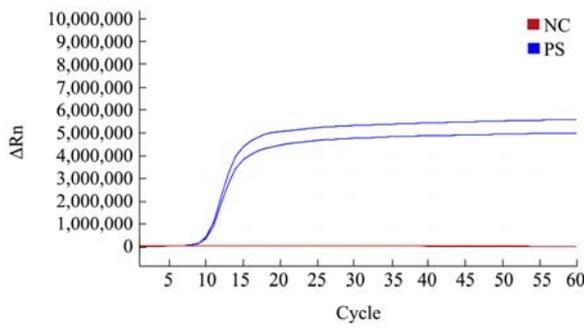


图2 CSFV-2 引物筛选检测结果

Fig.2 CSFV-2 primer screening test results

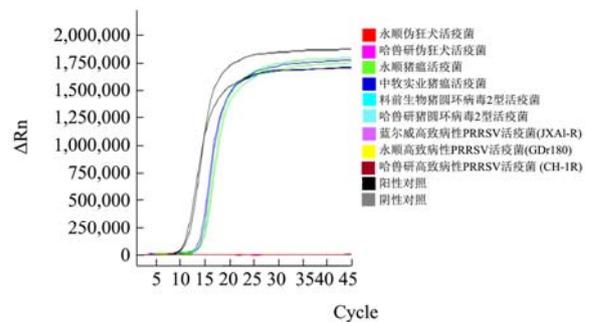


图5 特异性检测结果-1

Fig.5 Specific test result-1

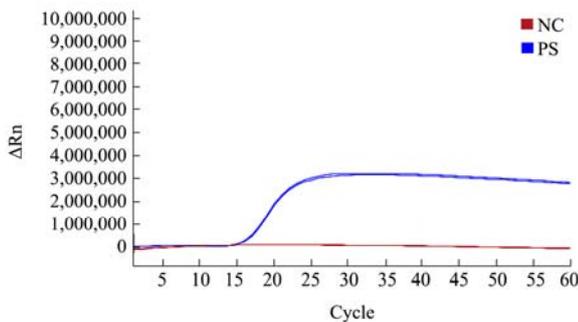


图3 CSFV-3 引物筛选检测结果

Fig.3 CSFV-3 primer screening test results

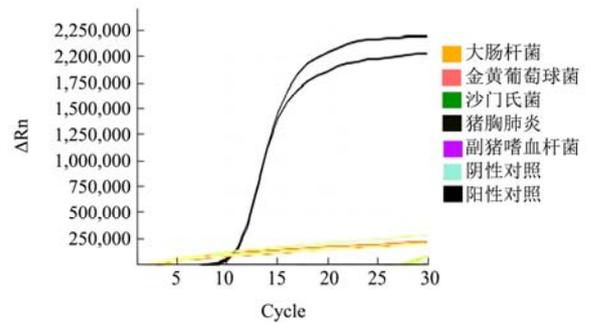


图6 特异性检测结果-2

Fig.6 Specific test result-2

### 2.1.2 CSFV 实时荧光 LAMP 检测方法的特异性分析

为确认 CSFV 实时荧光 LAMP 检测方法的特异性，分别以猪瘟活疫苗、猪伪狂犬活疫苗、高致病型猪繁殖与呼吸综合征活疫苗、猪圆环病毒 2 型活疫苗、猪胸膜炎放射杆菌、大肠杆菌、副猪嗜血杆菌、金黄色葡萄球菌和沙门氏菌的核酸为模板进行实时荧光 LAMP 方法检测。结果如图 5 和图 6 所示：猪瘟活疫苗均出现扩增反应，呈阳性，出峰时间略晚于阳性对照；其余病原均呈阴性，无扩增反应，表明所建立的

### 2.1.3 CSFV 实时荧光 LAMP 检测方法的灵敏度分析

分别以 1 ng/μL、100 pg/μL、10 pg/μL、1 pg/μL、100 fg/μL、10 fg/μL、1 fg/μL、0.1 fg/μL、0.01 fg/μL 的 CSFV 质粒 DNA 为模板，分析 CSFV 实时荧光 LAMP 检测方法的灵敏度。结果如图 7 所示：1 ng/μL~10 fg/μL 的质粒 DNA 出现了扩增反应，检测结果为阳性，而 1 fg/μL 的质粒 DNA 检测结果为部分阳性（三个重复中两个检测阳性，一个检测阴性），0.01 fg/μL 的质粒 DNA 未出现扩增反应，检测结果为阴性，表明本方法的灵敏度为 10 fg/μL。

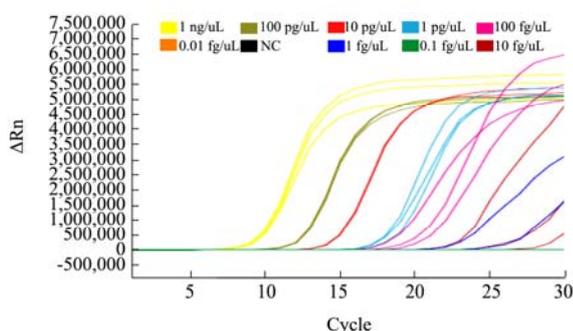


图7 灵敏度检测结果

Fig.7 Sensitivity test result

注：阴性对照：超纯水。

### 2.1.4 CSFV 实时荧光 LAMP 检测方法的临床适用性

用建立的 CSFV 实时荧光 LAMP 检测方法与参考国家标准 (GB/T 27540-2011) 的实时荧光 real-time PCR 方法同时检测 128 份临床样品, 其中实时荧光 LAMP 法和实时荧光 real-time PCR 法检测结果一致 (表 2), 1 份呈阳性, 127 份呈阴性, 二者的符合率为 100%。但由于阳性检测样本数较少, 后续增加人工干扰实验以验证不同检测样本背景对本方法检测效果是否存在干扰。

表 2 临床样本检测结果对比表

Table 2 Contrast table of clinical sample test results

对比项	实时荧光real-time PCR 检测方法 (国家标准)		合计
	阳性	阴性	
本研究	1	0	1
检测方法	0	127	127
合计	1	127	128

### 2.1.5 临床样本实际应用

表 3 人工干扰阴性样本检测结果对比表

Table 3 Contrast table of artificial interference negative samples

对比项	实时荧光real-time PCR 检测方法 (国家标准)		合计
	阳性	阴性	
本研究	22	0	22
检测方法	0	0	0
合计	22	0	22

用建立的 CSFV 实时荧光 LAMP 检测方法与参考国家标准 (GB/T 27540-2011) 的实时荧光 real-time PCR 同时检测 22 份掺有猪瘟疫苗核酸的临床样品。其中实时荧光 LAMP 法和实时荧光 real-time PCR 法检测结果一致 (表 3), 22 份呈阳性, 0 份呈阴性, 二

者符合率为 100%, 表明本试验建立的 CSFV 实时荧光 LAMP 检测方法不易受不同样本背景的干扰, 仍能保证其检测效果。

## 2.2 讨论

猪瘟是一种猪高度接触性致死性传染病, 给世界养猪业造成巨大威胁和经济损失, 被世界动物卫生组织 (OIE) 列为必须报告的法定传染病之一, 在我国被列为一类动物传染病, 除西藏等地的 28 个省市均有猪瘟疫情的报道, 且疫情能从一个省份迅速传播到多个省份, 导致大面积的猪群死亡<sup>[10-13]</sup>。我国在广泛使用猪瘟弱毒疫苗免疫后, 猪瘟疫情得到了有效控制。虽规模化猪场典型急性猪瘟大面积爆发现象已不常见, 但猪瘟的发生尤其是非典型猪瘟仍然普遍存在<sup>[12,14]</sup>。

目前, CSFV 常规的检测方法有病毒分离、免疫荧光、ELISA、实时荧光 PCR 等<sup>[15]</sup>。病毒分离法的检测过程需 4~5 d, 耗时长, 且操作过程繁琐不适于大规模临床诊断<sup>[16,17]</sup>; 免疫荧光和 ELISA 法虽然操作方便、灵敏度高, 但对设备和操作人员要求高, 且特异性方面存在不足, 易出现非特异性结果<sup>[3,18]</sup>; 实时荧光 PCR 法灵敏度高、特异性强, 但是耗时长, 实验所需设备昂贵, 不利于向广大基层用户普及使用<sup>[15,18]</sup>。因此, 建立一种快速、准确、操作简便的猪瘟检测方法对基层猪瘟的诊断和疫情控制有着重大意义。

环介导等温扩增技术 (LAMP) 是 Notomi 等于 2000 年建立的一种新型体外核酸扩增技术, 其原理是采用六条特殊引物 (内引物 FIP/BIP、外引物 F3/B3 和环引物 LF/LB) 特异性的识别靶序列的 8 个区域, 利用具有链置换活性的 Bst DNA 聚合酶, 在 60~65 °C 恒温条件下催化合成新链, 1 h 内即可扩增 10<sup>9</sup> 靶序列拷贝<sup>[19]</sup>。实时荧光环介导等温扩增检测技术操作省时, 本试验可在 30 min 即完成对 CSFV 的检测, 比实时荧光 RT-PCR 的 60 min 左右<sup>[20]</sup>和普通环介导扩增的 50 min<sup>[21]</sup>要快得多; 在灵敏度方面, 常规 LAMP 检测猪瘟活疫苗 RNA 的最低灵敏度为 13.6 fg/μL<sup>[21]</sup>、实时荧光 PCR 检测猪瘟病毒最低浓度为 10 拷贝/μL<sup>[22]</sup>, 本检测方法的 10 fg/μL 与其相当; 与可视化的 RT-LAMP 方法相比, 本研究方法利用实时荧光检测设备观察反应过程中荧光强度的变化, 可最大化减少假阳性结果的干扰, 以提高结果判断的准确率<sup>[21]</sup>。

## 3 结论

3.1 本研究针对 CSFV 基因组 5'UTR 非编码区设计了特异性引物, 建立了一种快速、简便的实时荧光 LAMP 检测方法, 可在 30 min 内完成对 CSFV 的检测。

用本研究建立的猪瘟实时荧光 LAMP 法检测猪伪狂犬病毒、猪圆环病毒 2 型和高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒等 8 种病原, 结果均为阴性, 说明本方法特异性良好; 本研究方法的最低检测浓度为 10 fg/ $\mu$ L, 说明本研究方法灵敏度高(如 2.2 所述)。同时, 通过对 128 份临床样品和 22 份人工污染样品检测结果可知, 本方法与实时荧光 real-time PCR 方法检测结果具有高度的一致性检测, 表明本方法的有效性。对于动物疫病检测而言, 检测速度关乎疫情防控的成败。与已报道的文献<sup>[18,23-26]</sup>相比, 本研究方法大缩短了检测时间, 灵敏度却和国家标准实时荧光 real-time PCR 方法相当。因此, 本研究建立的 CSFV 病毒实时荧光 LAMP 检测方法将具有更广阔的应用前景。

3.2 综上所述, 本研究建立的猪瘟实时荧光 LAMP 检测方法具有灵敏度高、特异性好、反应时间短、操作简便等优点, 将为猪瘟的早期诊断、快速筛查及无猪瘟疫苗免疫猪场的 CSF 净化提供有效的诊断工具, 对于我国猪瘟防控具有重要意义。

## 参考文献

- [1] YANG Ling, LU Xin-geng, FANG Wei-huan. Expression and purification of classical swine fever virus E2 protein from Sf9 cells using a modified vector [J]. *Biotechnology Letters*, 2017, 39(27): 1821-1825
- [2] 任世斌, 赵亮, 郭抗抗, 等. 猪瘟综合防控研究进展[J]. *动物医学进展*, 2018, 39(9): 100-106  
REN Shi-bin, ZHAO Liang, GUO Kang-kang, et al. Progress on comprehensive control of classical swine fever [J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2018, 39(9): 100-106
- [3] 孙元, 仇华吉. 中国猪瘟净化之路: 离我们还有多远?[J]. *中国农业科学*, 2018, 51(21): 4169-4176  
SUN Yuan, QIU Hua-ji. Eradication of classical swine fever in china: is it far away? [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2018, 51(21): 4169-4176
- [4] 诸婷婷, 郝彦龙, 袁小平, 等. 猪瘟病毒检测方法研究进展[J]. *甘肃畜牧兽医*, 2017, 47(1): 41-42, 46  
ZHU Ting-ting, HE Yan-long, YUAN Xiao-ping, et al. Research progress on detection methods of classical swine fever virus [J]. *Gansu Animal Husbandry and Veterinary*, 2017, 47(1): 41-42, 46
- [5] Haegeman A, Dewulf J, Vrancken R, et al. Characterisation of the discrepancy between PCR and virus isolation in relation to classical swine fever virus detection [J]. *Journal of Virological Methods*, 2006, 136: 44-50
- [6] 张明敬, 史慧. 猪瘟病毒实验室检测技术[J]. *养殖与饲料*, 2018, 1: 50-51  
ZHANG Ming-jing, SHI Hui. Laboratory detection technology of classical swine fever virus [J]. *Animals Breeding and Feed*, 2018, 1, 50-51
- [7] 朱子健, 唐志芬, 杨金雨, 等. 猪瘟兔化弱毒疫苗与猪圆环病毒 2 型灭活疫苗同时接种的免疫效果评价[J]. *中国预防兽医学报*, 2017, 39(2): 148-151  
ZHU Zi-jian, TANG Zhi-fen, YANG Jin-yu, et al. Evaluation of the immune effect on co-administering of swine fever vaccine and porcine circovirus type 2 inactivated vaccine [J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2017, 39(2): 148-151
- [8] ZHU Ting-ting, HE Yan-long, YUAN Xiao-ping, et al. Research progress on detection methods of classical swine fever virus [J]. *Gansu Animal Husbandry and Veterinary*, 2017, 47(1): 41-42, 46
- [9] Haines F J, Hofmann M A, King D P, et al. Development and validation of a multiplex, real-time RT PCR assay for the simultaneous detection of classical and african swine fever viruses [J]. *Plos One*, 2013, 8(7): e71019
- [10] 夏迎春. 我国猪瘟的流行现状与防控措施建议[J]. *当代畜禽养殖业*, 2017, 2: 51  
XIA Ying-chun. Epidemic status and proposals for prevention and control of classical swine fever in China [J]. *Modern Animal Husbandry*, 2017, 2: 51
- [11] 余亚飞. 我国猪瘟流行现状与防控措施建议[J]. *农业与技术*, 2015, 35(16): 189  
YU Ya-fei. Epidemic Status and proposals for prevention and control of classical swine fever in China [J]. *Agriculture and Technology*, 2015, 35(16): 189
- [12] 朱连德, 孙德林, 张金辉. 国内外猪瘟防控与净化[J]. *猪业科学*, 2017, 34(11): 6  
ZHU Lian-de, SUN De-lin, ZHANG Jin-hun. Prevention and control of piglets at home and abroad [J]. *Swine Industry Science*, 2017, 34(11): 6
- [13] 尹彩霞. E2 蛋白在猪瘟病毒内化中作用的研究[D]. 荆州: 长江大学, 2018  
YIN Cai-xia. The Role of the E2 Protein in the Internalization of classical swine fever virus [D]. Jingzhou: Yangtze University, 2018
- [14] 张莉. 大型猪场猪瘟免疫失败原因的分析[J]. *养殖技术顾问*, 2014, 2: 116  
ZHANG Li. Analysis of the causes of immune failure in pigs in large pig farms [J]. *Technical Advisor for Animal Husbandry*, 2014, 2: 116

- [15] 王向鹏,张兴娟,孙元,等.六种检测猪瘟病毒方法的比较[J].微生物学报,2010,50(8):1087-1093  
WANG Xiang-peng, ZHANG Xing-juan, SUN Yun, et al. Comparison of six methods for detection of classical swine fever virus [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2010, 50(8): 1087-1093
- [16] 陈洵,冯雪梅,杜正平,等.环介导恒温扩增法检测肉制品中致病微生物[J].肉类研究,2011,25(11):29-33  
CHEN Xun, FENG Xue-mei, DU Zheng-ping, et al. Rapid detection of listeria monocytogenes in meat product using loop-mediated isothermal amplification method [J]. Meat Research, 2011, 25(11): 29-33
- [17] CHEN Lei, FAN Xue-zheng; WANG Qin, et al. A novel rt-lamp assay for rapid and simple detection of classical swine fever virus [J]. Virologica Sinica, 2010, 25(1):59-64
- [18] 朱俊灵,叶佐东,邓洁汝,等.猪瘟病毒RT-LAMP-LFD检测方法的建立与应用[J].华南农业学报,2016,37(1):1-7  
ZHU Jun-ling, YE Zuo-dong, DENG Jie-ru, et al. Rapid detection of classical swine fever virus by loop-mediated isothermal amplification combined with lateral flow dipstick method [J]. Journal of South China Agricultural University, 2016, 37(1): 1-7
- [19] Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. Nucleic Acids Research, 2000, 28(12): E63
- [20] 李军,潘艳,禰雄标,等.猪瘟病毒实时荧光定量RT-PCR检测方法的建立和初步应用[J].中国畜牧兽医,2011,38(3):116-119  
LI Jun, PAN Yan, XUAN Xiong-biao, et al. Establishment and application of real-time fluorogenetic quantitative RT-PCR for detection of classical swine fever virus [J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2011, 38(3): 116-119
- [21] 郑新添,黄其春,黄翠琴,等.猪瘟病毒环介导等温扩增快速检测方法的建立[J].黑龙江畜牧兽医,2015,9:166-168, 270  
ZHENG Xin-tian, HUANG Qi-chun, HUANG Cui-qin, et al. Establishment of a rapid detection method for loop-mediated isothermal amplification of classical swine fever virus [J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2015, 9: 166-168, 270
- [22] 王淑娟,刘梅芬,闫若潜,等.猪瘟病毒实时荧光定量PCR检测方法的建立与应用[J].中国畜牧兽医,2017,44(7):2112-2118  
WANG Shu-juan, LIU Mei-fen, YAN Ruo-qian, et al. Establishment and application of real-time quantitative pcr assay for detection of classical swine fever virus [J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2017, 44(7): 2112-2118
- [23] 郭抗抗,邓力,井勇,等.猪瘟病毒强毒株和兔化弱毒疫苗株RT-PCR快速鉴别检测方法的建立[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2010,38(6):13-18  
GUO Kang-kang, DENG Li, JING Yong, et al. Development of RT-PCR for detection and differentiation of wild-type and vaccine viruses of classical swine fever virus [J]. Journal of Northwest A & F University (Natural Science Edition), 2010, 38(6): 13-18
- [24] 刘俊,王琴,范学政,等.猪瘟病毒野毒株TaqMan-MGB荧光定量PCR鉴别方法的建立与应用[J].中国农业科学,2009,42(12):4366-4371  
LIU Jun, WANG Qin, FAN Xue-zheng, et al. Differentiation of wild-type viruses and HCLV vaccine of classical swine fever virus by one-step fluorescent quantitative PCR using TaqMan-MGB probe technology [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2009, 42(12): 4366-4371
- [25] 张兴娟,孙元,刘大飞,等.猪瘟病毒野毒株RT-LAMP可视化检测方法的建立[J].中国预防兽医学报,2009,31(11):864-868  
ZHANG Xing-juan, SUN Yuan, LIU Da-fei, et al. Visualized detection of wild-type classical swine fever virus using RT-LAMP [J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2009, 31(11): 864-868
- [26] 张改平,何文博,王德国,等.猪瘟强毒株与兔化弱毒疫苗株的LAMP鉴别检测[J].郑州大学学报(理学版),2014,46(3):85-90  
ZHANG Gai-ping, HE Wen-bo, WANG De-guo, et al. Loop-mediated Isothermal amplification assay for differentiation and detection of virulent and vaccine strains of classical swine fever virus [J]. Journal of Zhengzhou University (Natural Science Edition), 2014, 46(3): 85-90